



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia delle Malattie del Fegato.
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S)
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Studio dei meccanismi molecolari di risposta al sorafenib e
identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento del
carcinoma epatocellulare

IL DOTTORE
Maria Rita Emma

IL COORDINATORE
Prof. Pier Luigi Almasio

IL TUTOR
Prof. Giuseppe Montalto

CO TUTOR
Dott. Melchiorre Cervello

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
Il Carcinoma Epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio.....	2
Epatocarcinogenesi.....	8
Alterazione delle vie di segnalazione.....	11
Trattamento.....	15
Sorafenib:meccanismo d'azione.....	17
Stress del reticolo Endoplasmatico (ER stress).....	20
ER stress e HCC.....	22
Nupr1/p8 e cancro.....	23
OBIETTIVI DELLA TESI.....	28
MATERIALI E METODI.....	29
RISULTATI.....	41
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	69
Bibliografia.....	74

INTRODUZIONE

Il Carcinoma Epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio

Il Carcinoma Epatocellulare (HCC) è uno dei tumori maligni più comuni nel mondo. Globalmente, esso risulta essere il quinto tra le forme di neoplasia più diffuse e rappresenta la terza causa di morte per cancro, con una stima di più di 600.000 nuovi casi ogni anno.

Esiste una notevole eterogeneità geografica nell'incidenza dell'HCC con un 80% di nuovi casi nei paesi in via di sviluppo. Le aree ad alta incidenza, infatti, includono l'Africa Sub-Sahariana e il Sud-Est Asiatico, mentre le aree a bassa incidenza includono il Nord-Europa, l'Europa Occidentale e il Nord-America (1) (figura 1).

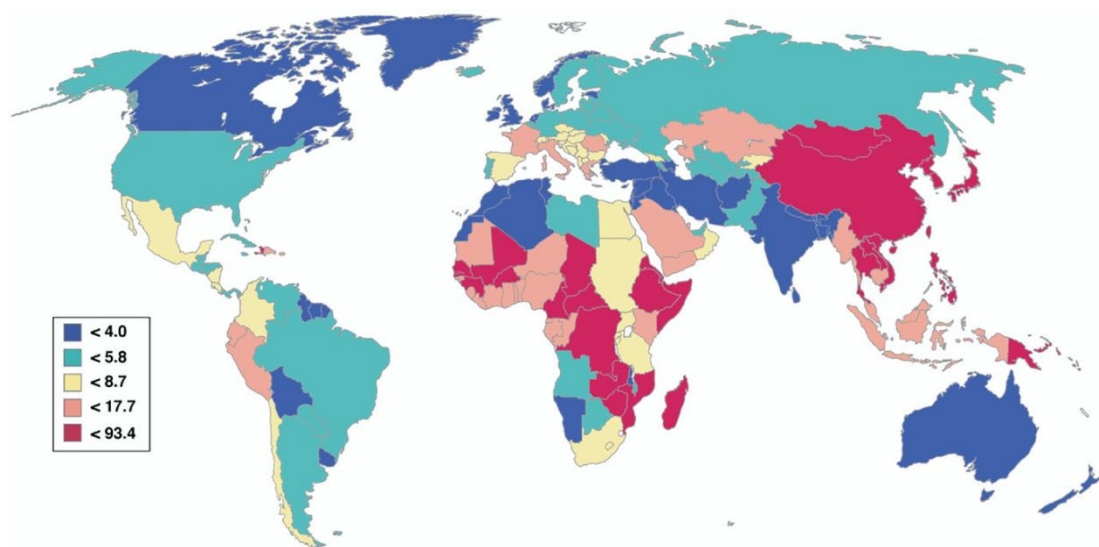


Figura 1. Distribuzione mondiale dell'incidenza del carcinoma epatico.

Inoltre, il tasso di incidenza dell'HCC varia ampiamente anche in base al sesso con un rapporto maschi/femmine di 2-4:1 nella maggior parte delle popolazioni (1). Le ragioni di ciò possono essere correlate alle differenze sesso-specifiche esistenti nell'esposizione ai fattori di rischio. Tuttavia, studi sperimentali condotti su topi hanno mostrato un aumento di insorgenza dell'HCC da 2 a 8 volte maggiore in topi maschi e ciò supporta l'ipotesi che, accanto all'esposizione sesso-specifica ai fattori di rischio per l'HCC, anche fattori maschili endogeni possono essere correlati allo sviluppo del tumore, inclusi i maggiori livelli circolanti di ormoni androgenici. D'altronde, è stata dimostrata negli uomini un'associazione positiva tra l'aumento del livello di testosterone circolante e l'HCC correlato all'infezione del virus dell'epatite B (HBV). (2)

Lo sviluppo asintomatico di questo tipo di tumore, la sua progressione maligna, la scarsa efficacia dei trattamenti attualmente in uso, rendono spesso infausta la prognosi dell'HCC, con un indice di sopravvivenza minore del 5% a 5 anni dalla diagnosi (3).

Tuttavia, il migliore controllo dei fattori di rischio ha determinato un recente declino dell'incidenza dell'HCC in alcuni paesi, come in Cina, in Taiwan e in USA. Al contrario, recentemente, si è registrato un trend in aumento di casi di HCC nei paesi sviluppati e in Europa, probabilmente da correlare alla maggiore diffusione del virus dell'epatite C (HCV) (1, 4); si riscontra perciò un crescente interesse alla sua patogenesi molecolare e agli aspetti correlati all'epidemiologia e al trattamento.

L'ampia variabilità geografica dell'incidenza dell'HCC nelle diverse aree del mondo può essere spiegata con l'eterogeneità della penetrazione, all'interno delle popolazioni, dei diversi fattori di rischio (5).

Tra le cause di danno epatico responsabili dell'insorgenza del tumore al fegato, le più importanti sono le infezioni da HBV e HCV, il consumo di alcol, l'emocromatosi e il morbo di Wilson, la steatoepatite non-alcolica e la cirrosi biliare primaria (figura 2).

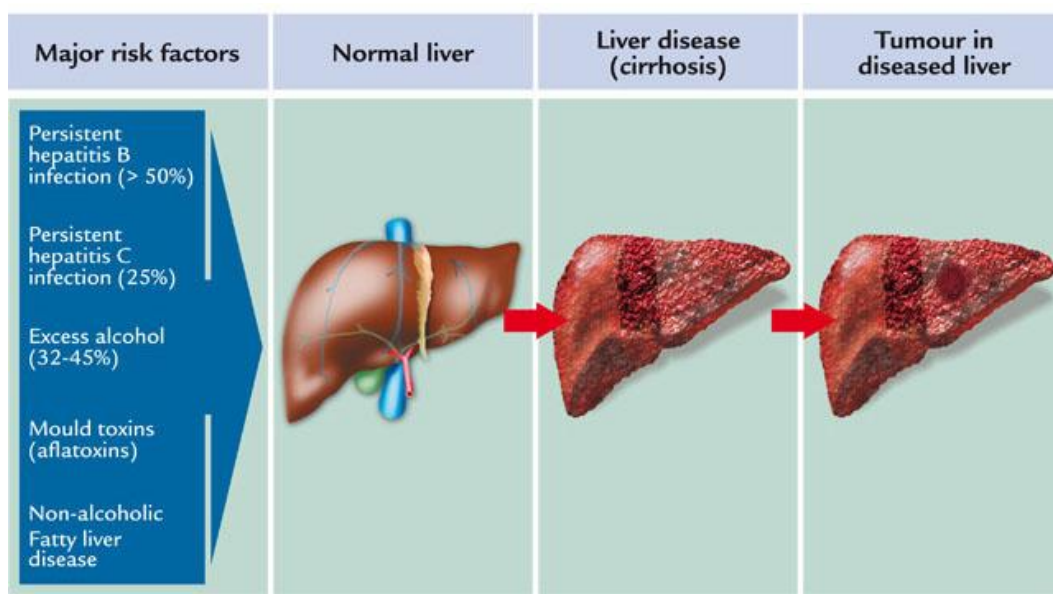


Figura 2. Principali fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare.

HBV

Globalmente, l'infezione da HBV rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma, soprattutto nelle aree in cui il virus è endemico. In particolare,

l'infezione da HBV ha un'elevata prevalenza nei paesi sottosviluppati ed in alcune aree dell'Asia: qui, l'infezione viene acquisita alla nascita o nei primi anni di vita (4).

L'HBV potrebbe iniziare la trasformazione dell'epatocita tramite l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula che condurrebbe ad una instabilità genomica a causa di mutazioni, delezioni, traslocazioni e riarrangiamento; si tratta, infatti, di un virus a DNA che presenta un ciclo vitale peculiare che include una fase di integrazione del genoma virale all'interno del genoma cellulare dell'ospite.

Questo processo può determinare l'attivazione di geni endogeni, come la ciclina A e SERCA1 che stimolano la proliferazione cellulare, provocando una rigenerazione epatica incontrollata.

L'integrazione dell'HBV-DNA nel genoma cellulare dell'ospite, inoltre, potrebbe deregolare l'espressione di oncogeni e oncosoppressori che, fisiologicamente, sono in grado di controllare e bilanciare i segnali di morte e sopravvivenza cellulare.

Infine, l'HBV può indurre epatocarcinogenesi attraverso l'espressione di proteine virali che hanno proprietà oncogene, come la proteina HBx. Attraverso la sua capacità di agire a livello di specifici promotori, l'HBx è in grado di modificare l'espressione di alcuni geni che sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, come, ad esempio, il gene che codifica la proteina p53, importante oncosoppressore e induttore del processo apoptotico. Questi effetti della proteina x sul gene *p53* potrebbero favorire la trasformazione maligna degli epatociti infettati da HBV. E' verosimile che in questi casi entrino in gioco altri fattori di rischio, quali la co-infezione con HCV, l'alcool, l'aflatossina o altri agenti sconosciuti in grado di dare cirrosi e/o promozione della trasformazione neoplastica (6).

HCV

HCV è un agente virale trasmesso attraverso il contatto con sangue infetto e rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di HCC in Europa, Giappone e America. Spesso l'infezione da HCV si sovrappone all'assunzione cronica di alcol che, in alcune aree, come in Francia rappresenta il maggiore agente oncogenico. L'incidenza crescente dell'HCC HCV-correlato è legata probabilmente alla diffusione massiva del virus verificatasi 20-40 anni fa (4). Il virus entra nell'organismo attraverso il sangue e tramite il circolo ematico raggiunge il fegato, per il quale ha uno spiccato tropismo, replicandosi negli epatociti. Dopo un periodo di incubazione, variabile da 5 a 12 settimane, può causare una prima sintomatologia caratterizzata da ittero e malessere generale.

Nell'80% dei casi, il virus persiste nell'organismo e causa un'infezione cronica che, può essere ancora asintomatica. Durante questa fase, l'HCV si replica attivamente all'interno degli epatociti infetti e ciò fa sì che tutti i pazienti con infezione cronica sviluppino un'epatite con quadri istologici compresi tra epatiti croniche lievi e quadri ad evoluzione cirrogena.

Circa il 20% dei pazienti con infezione cronica da HCV sviluppano, infatti, cirrosi epatica a distanza di 10-20 anni dall'inizio dell'infezione.

Tuttavia, esiste una notevole variabilità in termini di suscettibilità allo sviluppo del meccanismo cirrogeno che sembra più diffusa nei soggetti maschi dediti al consumo di alcol. Altri fattori che possono influenzare il rischio di evoluzione dell'infezione cronica in cirrosi, e poi in epatocarcinoma, ma sembrano essere rappresentati dalla durata dell'infezione e dal genotipo virale, in particolare, sembra che il genotipo 1b di HCV sia associato a forme più gravi (6).

Contrariamente all'HBV, l'HCV è un virus ad RNA che non si integra nel genoma cellulare dell'ospite ma è in grado di indurre epatocarcinogenesi attraverso interazioni proteiche.

Nel processo di infezione, dopo una prima fase di adsorbimento, il virus libera il suo genoma all'interno del citoplasma cellulare. E' noto che una volta penetrato nel citoplasma, il genoma di HCV, essendo costituito da un filamento di RNA a polarità positiva, viene direttamente tradotto in una poliproteina che subisce una serie di processi proteolitici che porteranno poi alla produzione delle proteine virali mature (6).

In particolare, la proteina core e le proteine non strutturali 3 e 5A (NS3 e NS5A) sono i fattori più coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi HCV-correlata (7).

La proteina core di HCV, infatti, agisce da proteina polifunzionale con capacità regolatrici della proliferazione cellulare e della regolazione trascrizionale di alcuni geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare, come il proto-oncogene c-myc. Inoltre, questa proteina potrebbe indurre epatocarcinogenesi attraverso altri meccanismi, come la modifica del rilascio del fattore di necrosi tumorale α (TNF α) che, come è noto, influenza l'equilibrio fisiologico che si instaura tra processi di morte e sopravvivenza cellulare (7).

Nella trasformazione cellulare degli epatociti cronicamente infettati da HCV è stato ipotizzato un possibile ruolo anche delle proteine di HCV non strutturali, note come NS3, che negli stadi precoci porterebbe a mutazione di p53, e NS5A che reprimerebbe la trascrizione del gene regolatore del ciclo cellulare p21WAF1 (6).

ALCOL

L'abuso di alcol, definito dal consumo di più di 50-70 g/giorno per prolungati periodi di tempo, rappresenta un fattore di rischio accertato per lo sviluppo di epatocarcinoma (8).

Il meccanismo esatto di epatocarcinogenesi alcol-correlata è ancora poco chiaro, dal momento che, di per sé, l'etanolo non è un carcinogeno.

E' noto, comunque, che molteplici meccanismi possono essere coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi alcol-correlata tra cui: i) l'effetto locale dell'etanolo, ii) l'accumulo nei tessuti e nelle cellule di acetaldeide, metabolita dell'etanolo, agente tossico e cancerogeno, iii) l'induzione dell'isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1), coinvolta nel metabolismo dell'etanolo, iv) deficit nutrizionali, v) interazione con retinoidi, vi) cambiamento nel grado di metilazione del DNA.

L'alcol, inoltre, potrebbe agire come co-carcinogeno amplificando l'effetto di carcinogeni diretti come quelli ritrovati nel fumo di tabacco o nella dieta, attraverso l'induzione di diverse isoforme degli enzimi della famiglia CYP450 (9).

Durante la reazione metabolica catalizzata dall'isoforma CYP2E1 si formano radicali idrossietilici responsabili del danno genotossico al DNA (8, 9). L'induzione del citocromo CYP2E1, inoltre, determina un abbassamento dei livelli di acido retinoico, per aumento del suo metabolismo, ed un'incrementata espressione del gene AP1 associata all'aumentata attività delle proteine c-jun e c-fos. Tale fattore di trascrizione è responsabile dell'espressione della ciclina D1, associata ad iperproliferazione cellulare (9). D'altra parte, studi sperimentali condotti su animali hanno mostrato che la somministrazione esogena di acido retinoico è in grado di ristabilire il normale livello di espressione del gene AP1 bloccando il processo di iperproliferazione epatocitaria. Questi dati sottolineano che bassi livelli di acido retinoico, determinati dall'ingestione cronica di alcol, rivestono un ruolo fondamentale nella promozione dell'epatocarcinogenesi (10).

Inoltre, l'assunzione cronica di alcol può determinare l'induzione del processo di epatocarcinogenesi attraverso un altro meccanismo che prevede la riduzione dei livelli di metilazione di alcune citosine (C) a livello di specifiche regioni del DNA. Cambiamenti del livello di metilazione delle C sono, infatti, frequentemente associate a diverse forme di cancro umano ma la loro rilevanza come fattori epigenetici associati al processo di carcinogenesi è stata solo parzialmente compresa. E' noto che la metilazione del DNA rappresenta un importante meccanismo di controllo dell'espressione genica in quanto l'ipermetilazione ha un

effetto di silenziamento genico, mentre l'ipometilazione determina un incremento dell'espressione genica. Alterazioni del livello di metilazione del DNA epatico ed, in particolare, condizioni di ipometilazione di alcuni oncogeni, sono state osservate in modelli sperimentali di alcolismo cronico e sono state valutate come fattori favorenti lo sviluppo di HCC (9).

E' importante comunque sottolineare che in tutti questi processi, l'etanolo assunto cronicamente mediante il consumo di bevande alcoliche, non agisce da carcinogeno diretto in quanto è la sua associazione ad altri fattori ad essere responsabile dell'induzione dell'epatocarcinogenesi.

AFLATOSSINA B1

L'aflatossina B1 (AFB1) è il principale metabolita prodotto dai funghi del genere *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus* che possono crescere su diversi prodotti alimentari conservati in condizioni di eccessivo calore e umidità.

Dopo un'esposizione all'AFB1, grandi quantità di DNA danneggiato possono essere ritrovate nel fegato, come risultato della conversione dell'aflatossina nei suoi metaboliti attivi. L'AFB1 è, infatti, un agente mutageno e i suoi metaboliti attivi reagiscono con le guanine presenti nel DNA causando mutazioni geniche.

La più frequente mutazione indotta dall'aflatossina B1 è rappresentata dalla trasversione GC:TA (11). In particolare, l'AFB1 è in grado di determinare la sostituzione di un singolo nucleotide nel codone 249 del gene oncosoppressore p53, che si manifesta, a livello proteico, con la sostituzione aminoacidica di un'arginina con una serina.

Questa mutazione è presente in più del 50% dei pazienti con HCC che vivono nelle aree dove è alto il rischio di esposizione all'aflatossina, come Cina e Taiwan (8). Inoltre, è stato accertato che le aree con elevato rischio di esposizione all'AFB1 sono anche caratterizzate da un'elevata prevalenza dell'infezione di HBV. Tuttavia, l'esposizione all'AFB1 è indipendente dal rischio di HCC conferito dall'infezione di HBV, anche se l'esposizione concomitante ad HBV e all'AFB1 aumenta marcatamente il rischio di HCC (8).

MALATTIE GENETICHE E METABOLICHE

Alcune malattie ereditarie, come quelle caratterizzate da un sovraccarico di ferro all'interno dell'organismo ad esempio l'emocromatosi ereditaria, rappresentano dei fattori di rischio accertati, anche se poco prevalenti, di HCC.

Diversi studi hanno mostrato che la progressione verso l'HCC tra i pazienti emocromatosici è altamente variabile da una popolazione ad un'altra, in base principalmente alla concomitante esposizione ad altri fattori ambientali (12).

A livello molecolare, l'emocromatosi ereditaria è causata da mutazioni a carico del gene umano dell'emocromatosi (HFE) o da altre mutazioni responsabili del complesso metabolismo del ferro. Proprio a causa dell'eccessivo accumulo di ferro all'interno degli epatociti, i soggetti affetti da emocromatosi ereditaria vanno incontro più facilmente allo sviluppo di diverse patologie epatiche, tra cui l'epatocarcinoma con un rischio 20 volte maggiore rispetto alle altre forme di cancro. Tuttavia, l'emocromatosi ereditaria è solo una delle sindromi da sovraccarico di ferro che porta all'eccessivo deposito di ferro nel fegato e negli altri tessuti: infatti, tutti i pazienti con un eccesso di ferro, secondario ad altre eziologie, hanno mostrato un rischio più elevato di sviluppo di HCC, pur in assenza di emocromatosi ereditaria (8).

Inoltre, numerose evidenze suggeriscono che l'eccesso di tessuto adiposo e il diabete possono aumentare l'incidenza e/o la mortalità di numerosi tumori, incluso l'HCC.

Obesità e diabete possono correlare con la steatoepatite non-alcolica (Non-Alcoholic SteatoHepatitis, NASH), una sindrome con caratteristiche fisiopatologiche simili alla steatoepatite alcolica, caratterizzata dall'accumulo di grasso nelle cellule parenchimali epatiche che può promuovere infiammazione e necrosi. La NASH rappresenta un fattore di rischio accertato per HCC attraverso la progressione della malattia steatoepatitica a cirrosi e ad HCC.

Epatocarcinogenesi

La carcinogenesi epatica è un processo multistep caratterizzato dal progressivo accumulo di anomalie cromosomali, genetiche ed epigenetiche che si manifestano con cambiamenti del fenotipo cellulare wild-type e che possono risultare in una disfunzione cellulare.

Il carcinoma epatocellulare si sviluppa, infatti, nella gran parte dei casi in fegati affetti da epatopatia cronica di diversa eziologia, in fase più o meno avanzata, e solo raramente ha luogo in fegati apparentemente sani (1) (figura 3).

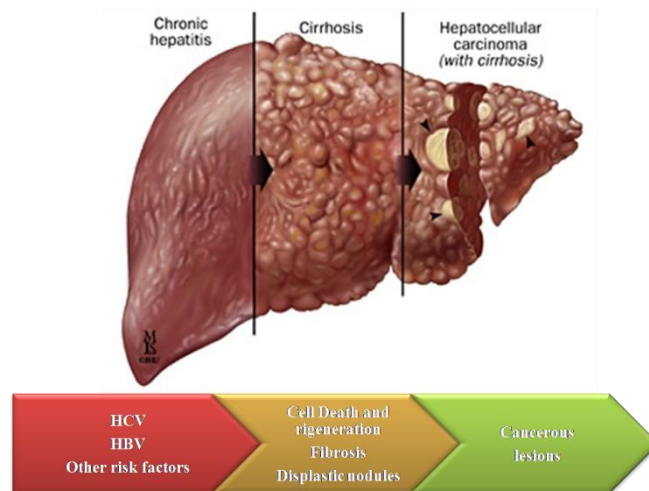


Figura 3. Principali tappe della carcinogenesi epatica.

La carcinogenesi epatica è un processo tipicamente multifasico; nell'HCC, infatti, l'instabilità cromosomica emerge già negli stadi precoci del tumore e si accumula durante il processo di epatocarcinogenesi determinando un fenotipo cellulare maligno.

Gli epatociti maligni, dunque, sono il risultato di cambiamenti sequenziali accumulati negli epatociti maturi o, in alternativa, possono derivare da cellule staminali.

L'ipotesi più accettata descrive un processo a tappe nel quale stimoli esterni inducono alterazioni genetiche negli epatociti maturi determinando morte cellulare, proliferazione cellulare e la produzione di popolazioni monoclonali. Queste popolazioni generano epatociti displastici che evolvono in noduli displastici.

I noduli ad elevato grado di displasia sono considerati a tutti gli effetti lesioni pre-neoplastiche e possono evolvere in tumori maligni nel 30% dei casi nell'arco di 1-5 anni. Inizialmente, i noduli non esibiscono una neovascolarizzazione ma in uno stadio più avanzato, gli epatociti esprimono un fenotipo maligno associato a neoformazioni vascolari che originano dall'arteria epatica. Questi tumori precoci ben differenziati diventano meno differenziati quando raggiungono dimensioni di 1-1,5 cm. Successivamente, le cellule

neoplastiche diventano indifferenziate e sono capaci di invadere i vasi e colonizzare altri tessuti determinando metastasi che sono caratteristiche dello stadio terminale di malattia (4).

Le differenti anomalie genetiche e cromosomali che determinano la progressione anatomopatologica del tumore sono diventati oggetto di numerosi studi che hanno l'obiettivo di riuscire ad identificare nuovi biomarcatori di HCC e nuovi targets molecolari di terapia anti-tumorale.

L'eterogeneità dei fattori eziologici rende conto della relativa complessità dei meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi, inoltre, l'assenza di un'ereditarietà evidente nell'HCC, riscontrata invece in altre forme di cancro, ha reso difficoltosa l'identificazione dei geni chiave per lo sviluppo di questo tipo di tumore e ha impedito la definizione di una gerarchia di eventi genetici coinvolti nei vari stadi della carcinogenesi epatica.

Il notevole progresso delle conoscenze ha consentito di verificare che numerose alterazioni cromosomiche intervengono nelle diverse fasi di sviluppo dell'HCC, inclusi i riarrangiamenti cromosomici legati all'integrazione dell'HBV-DNA, la perdita di eterozigosità (Loss of Heterozygosity, LOH) e il fenomeno di amplificazione genica a carico di alcuni geni. La perdita e l'acquisizione di specifici segmenti cromosomici vengono indicate complessivamente come instabilità cromosomica. Diversi studi hanno evidenziato, in molti casi di HCC, la perdita di siti specifici nei cromosomi 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 10q, 11p, 16p, 16q, 17p e 22q.

In particolare, un vasto studio condotto da Kuroki *et al.* ha dimostrato che l'instabilità cromosomica a livello del sito 1p è tipica degli HCC ben differenziati, mentre l'instabilità cromosomica a livello degli altri siti si riscontra negli stadi più avanzati del tumore e negli istotipi tumorali poco differenziati (13).

D'altra parte, l'acquisizione dei tratti cromosomici 1q21-23 e 8q22-24 è tra gli eventi genomici associati allo sviluppo precoce dell'HCC identificati in un vasto studio genomico condotto su 158 pazienti affetti da HCC HCV-correlato (14).

In aggiunta agli eventi di instabilità cromosomica, anche le alterazioni epigenetiche sembrano giocare un ruolo importante nel processo di epatocarcinogenesi.

Alterazioni delle vie di segnalazione

Il pathway Wnt/ β -catenina, coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi, nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi risulta essere deregolato in diversi tipi di tumore, incluso l'HCC.

Wnt fa parte di una famiglia di proteine secrete come molecole di segnalazione che regolano le interazioni cellula-cellula soprattutto durante l'embriogenesi. Mutazioni a carico di queste proteine possono generare differenti difetti nella fisiologia della cellula normale, tra cui anche l'acquisizione di un fenotipo tumorale.

Fisiologicamente, in assenza del segnale di Wnt, la β -catenina viene legata dal complesso APC/Axin/GSK-3 β che ne determina la fosforilazione in corrispondenza di specifici residui di serina e treonina. La β -catenina iperfosforilata viene, dunque, avviata alla degradazione mediata dal sistema ubiquitina-proteosoma, responsabile del mantenimento dei bassi livelli di β -catenina nel citoplasma cellulare. Quando, invece, il fattore Wnt si lega al suo recettore Frizzled (Frz) transmembrana viene attivata la via di segnalazione Wnt/ β -catenina ed il segnale di attivazione viene trasferito al citoplasma attraverso la fosforilazione della proteina dishevelled (Dvl). Questa proteina attivata dalla fosforilazione lega e sopprime l'attività della chinasi GSK-3 β che, quindi, non può più fosforilare la β -catenina e avviarla alla degradazione. La β -catenina ipofosforilata si trasferisce al nucleo dove, in associazione con i fattori di trascrizione TCF/Lef, può regolare positivamente la trascrizione genica di alcuni geni target, inclusi i proto-oncogeni come c-myc e ciclina D1 e favorire, in questo modo, la proliferazione cellulare (1).

Alterazioni di diversi fattori coinvolti nella regolazione di questa via di trasduzione del segnale sono coinvolte nell'insorgenza dell'HCC a partire da infezioni croniche virali e da cirrosi epatica alcolica. In particolare, tutte le mutazioni della β -catenina ritrovate all'interno dell'esone 3 del gene proteggono la proteina dalla degradazione favorendone l'accumulo a livello nucleare con conseguente attivazione dei proto-oncogeni target e iperproliferazione cellulare. Queste mutazioni a carico del gene per la β -catenina sono state frequentemente ritrovate negli HCC HCV/HBV-correlati (1).

In aggiunta a ciò, nel 5-10% dei casi di HCC sono state ritrovate mutazioni a carico di Axin1 che hanno sempre un effetto di stabilizzazione della β -catenina in quanto inibiscono la formazione del complesso di distruzione APC/Axin /GSK-3 β / β -catenina.

Altre alterazioni sono state ritrovate nei mediatori che si ritrovano a monte di questa via di segnalazione: l'iperespressione di Wnt e del suo recettore transmembrana Frz, il silenziamento epigenetico dell'antagonista di Wnt, sFRP1, l'iperespressione di Dvl e la riduzione dell'espressione dei suoi due inibitori, HDPR1 e Prickle1 (1).

La scoperta del coinvolgimento di tutti questi fattori nell'insorgenza dell'HCC sottolinea il ruolo centrale della via di segnalazione Wnt/ β -catenina nel processo di epatocarcinogenesi e, soprattutto, nella possibile identificazione di nuovi targets molecolari di terapia.

Tuttavia, accanto alle alterazioni del pathway Wnt/ β -catenina, numerosi altri fattori di disregolazione contribuiscono ad incrementare lo sbilanciamento del processo di regolazione dell'apoptosi a favore della sopravvivenza cellulare, facilitando così il processo di epatocarcinogenesi. Tra questi un ruolo importante è svolto dal nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), un fattore trascrizionale che rappresenta il regolatore chiave delle risposte immuni, innate e adattative, dell'infiammazione e della sopravvivenza cellulare, suggerendo un suo possibile ruolo nella tumorigenesi in condizioni di infiammazione cronica.

Molti stimoli pro-infiammatori attivano NF- κ B principalmente attraverso la via della fosforilazione IKK-mediata e la degradazione delle proteine inibitrici IKK- β .

Il ruolo dell'attivazione di NF- κ B negli stadi di promozione e progressione tumorale è divenuto chiaro solo recentemente quando è stata evidenziata in diversi tipi cellulari, la forte implicazione di questo fattore trascrizionale nella regolazione dell'espressione di alcuni fattori di crescita, come le cicline, e di diversi fattori anti-apoptotici e di multifarmacoresistenza. NF- κ B, infatti, svolge un ruolo importante anche nella regolazione di fattori anti-apoptotici come c-IAPs, c-FLIP e Bcl-XL coinvolti nella sopravvivenza delle cellule tumorali. E' stato osservato che l'attivazione costitutiva di NF- κ B rende le cellule tumorali altamente resistenti ai farmaci anti-tumorali mentre l'inibizione della sua attività aumenta la sensibilità di queste cellule alle stesse terapie.

Infine, NF- κ B influenza anche i processi di invasione e metastatizzazione tumorali attraverso la regolazione dell'espressione delle metallo proteinasi-2 (MMP-2) e MMP-9 che giocano un ruolo importante nella degradazione della matrice extracellulare e della membrana basale favorendo l'invasività tumorale.

Sulla base di queste evidenze è stato mostrato che diversi casi di HCC sono caratterizzati dall'attivazione costitutiva di NF- κ B nel tessuto tumorale rispetto ai tessuti non tumorali.

Questa condizione di attivazione costitutiva è determinata dall'elevata espressione di IKK- α e IKK- β , responsabili dell'attivazione di NF- κ B, la cui attività è fondamentale per produrre le caratteristiche maligne del tumore epatico (16).

Nel processo dell'epatocarcinogenesi, accanto al ruolo del fattore trascrizionale NF- κ B, numerosi altri processi contribuiscono allo sbilanciamento dell'equilibrio omeostatico che si crea, in condizioni fisiologiche, tra apoptosi e proliferazione cellulare, a favore di quest'ultima. In particolare, è stato dimostrato che alcune proteine, come suppressor of cytokine signaling 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3), che agiscono da soppressori del segnale delle citochine e che sono dei regolatori negativi della via di segnalazione Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT), risultano silenziate per metilazione sia in linee cellulari di epatoma umano sia in tessuti di epatocarcinoma, determinando l'attivazione costitutiva del pathway JAK/STAT e del fattore STAT3. La delezione di SOCS3 negli epatociti promuove dunque l'attivazione di STAT3, la resistenza cellulare all'apoptosi e l'accelerata proliferazione, risultando in un incremento del processo di epatocarcinogenesi (17).

Anche il pathway Phospho-inositide-3 Kinase/Akt (PI3K/Akt) risulta essere alterato nell'epatocarcinoma. Fisiologicamente questa via di segnalazione è implicata in una rete di trasduzione di segnali di sopravvivenza e proliferazione cellulare; alterazioni genetiche dei fattori coinvolti in questa via sono presenti in numerose neoplasie. Questo accade perché PI3K regola diversi target intracellulari (come Akt) che controllano la sopravvivenza cellulare, la mitogenesi e la neoangiogenesi.

L'espressione del prodotto genico Phosphatase and tensin homolog (PTEN), una fosfatasi che regola la defosforilazione di Akt, è ridotta o assente in circa la metà degli epatocarcinomi e l'eliminazione epatocita-specifica dell'espressione di PTEN nei topi dà come risultato lo sviluppo di HCC. D'altra parte, l'iperespressione epatica di questo fattore regola negativamente l'attività di PI3K nel tessuto e sopprime lo sviluppo di HCC (17).

Allo stesso modo, anche l'iperespressione della tirosina-chinasi Ras è stata frequentemente riscontrata in molti casi di HCC e determinata in parte dal silenziamento epigenetico di specifici inibitori del pathway di Ras. Fisiologicamente, in questa via di segnalazione Ras attivata da segnali di crescita determina l'attivazione della serina/treonina-chinasi Raf-1 che fosforila e attiva la chinasi Mitogen Activated Protein kinase (MEK), la quale a sua volta attiva la chinasi Extracellular signal receptor kinase (ERK) mediante fosforilazione e

quest'ultima, attraverso l'attivazione di diversi fattori trascrizionali, causa una maggiore crescita e proliferazione cellulare (18). Numerose evidenze hanno mostrato una marcata disregolazione di diversi inibitori di Ras ed ERK nell'epatocarcinoma con una conseguente iperattivazione dell'oncogene Ras che favorirà il processo di epatocarcinogenesi (17).

Accanto a queste alterazioni genetiche che determinano l'iperattivazione dei pathway oncogenici, nel processo molecolare di epatocarcinogenesi si riscontrano frequentemente anche mutazioni genetiche che determinano difetti nell'espressione e/o nello stato di attivazione di prodotti genici che agiscono da soppressori tumorali.

L'inattivazione di p53 e la presenza di difetti a valle del suo pathway di segnalazione sono stati ritrovati in tutti i tipi di tumori umani. In particolare, la perdita di funzione di p53 è stata osservata nel 25-60% dei tumori e principalmente è correlata a delezioni alleliche a livello del cromosoma 17q13 e a mutazioni missenso nel dominio specifico di legame al DNA. In ogni caso, la mutazione di p53 sembra sia un evento tardivo nel processo di oncogenesi e che sia associato con la progressione dell'HCC dagli stadi precoci a quelli più avanzati.

Poiché è noto che numerosi agenti chemioterapici necessitano di p53 per indurre l'apoptosi, appare evidente che la perdita di funzione di questa proteina, o la disregolazione del suo pathway a valle, contribuiscano a determinare uno stato di chemioresistenza del tumore (17).

In genere, comunque, le mutazioni di p53 si verificano in contesti di attivazione di processi carcinogeni endogeni come le infezioni croniche da virus epatotropi e condizioni di stress ossidativo che possono indurre danno al DNA e mutazioni di geni correlati, incluso p53.

Numerose alterazioni si riscontrano anche nei pathway apoptotici estrinseci che partono dai recettori di morte con una conseguente resistenza delle cellule epatiche tumorali ai segnali di induzione dell'apoptosi. In particolare, la perdita di risposta a Fas nelle cellule di HCC viene determinata sia attraverso la downregolazione dell'espressione dello stesso recettore, concomitante alla riduzione dell'espressione delle molecole a valle del suo pathway, sia attraverso la sovraregolazione di molecole che contrastano il suo effetto pro-apoptotico, come NF- κ B, Bcl-2 e Bcl-XL (17).

Ciò determina, come conseguenza, una resistenza all'apoptosi delle cellule di HCC in cui la ridotta espressione di fattori oncosoppressori insieme al marcato aumento dell'espressione di fattori oncogenici favorisce il processo di tumorigenesi attraverso le fasi di iniziazione, promozione e progressione tumorale.

La scoperta di tutte queste alterazioni genetiche specifiche negli epatociti maligni ha un ruolo fondamentale nella possibile futura identificazione di targets molecolari di terapie anti-tumorali efficaci a contrastare lo sviluppo dell'HCC.

Trattamenti

Il problema principale nel trattamento dell'HCC, per cui ancora oggi rappresenta una patologia difficile da trattare, è dovuto alla notevole variabilità geografica della sua incidenza, alle molteplici cause della sua insorgenza e agli aspetti eterogenei con cui si presenta, che in ultimo impediscono il consolidamento di una strategia terapeutica che sia globalmente efficace.

Come riportato in figura 4, trattamenti curativi come la resezione chirurgica, il trapianto di fegato e la radioterapia percutanea possono essere utili per quei pazienti che presentano tumori nei primi stadi di sviluppo e con funzioni epatiche ancora poco compromesse (30-40% degli HCC; stadi 0 e A della classificazione di Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC). La sopravvivenza per questi pazienti migliora del 65% in 5 anni. Sfortunatamente è piuttosto comune la recidiva trascorsi tre anni dal trattamento.

Per i pazienti non curabili chirurgicamente (40-70% degli HCC), cioè quelli che presentano tumori in stadi avanzati (stadi B e C di BCLC) e invasione vascolare (stadio C) sono più adatti trattamenti palliativi come la chemoembolizzazione, l'immunoterapia e la chemioterapia mirata.

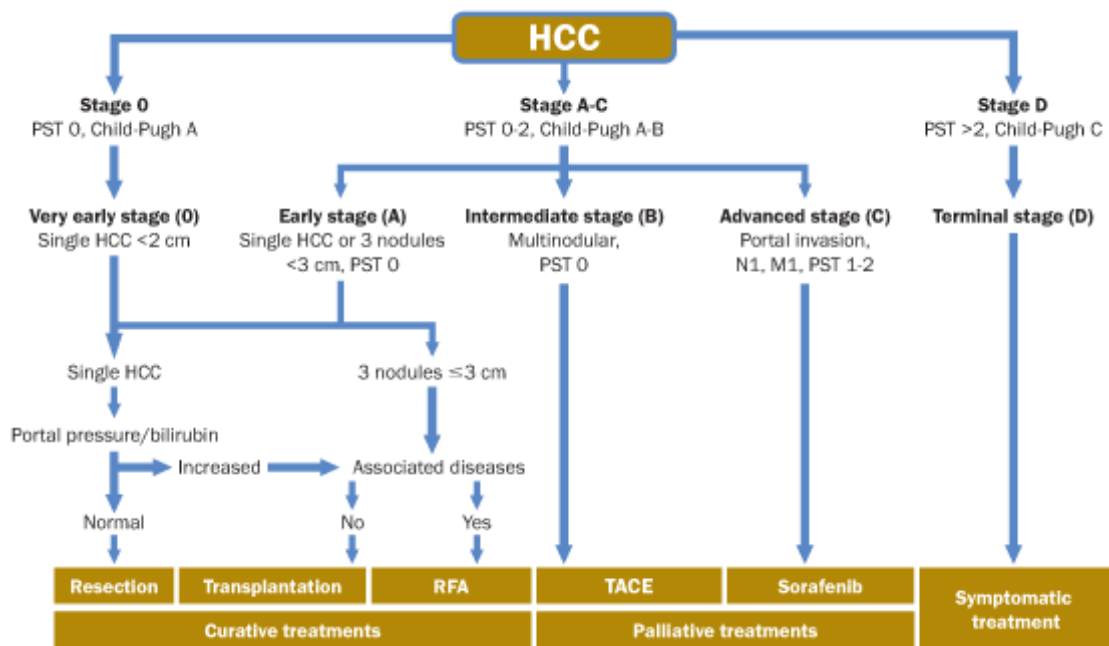


Figura 4. Trattamenti curativi del carcinoma epatocellulare secondo la classificazione BCLC.

Tuttavia, viste le numerose conoscenze acquisite nell'ambito della biologia molecolare dei tumori, gli sforzi della ricerca sono stati, e sono tuttora, rivolti all'identificazione di molecole antineoplastiche selettive che siano in grado di spegnere i pathway direttamente coinvolti nella tumorigenesi. Alcune di queste molecole sono state saggiate in fase preclinica e clinica ma, fino al 2006, nessuna di esse era risultata efficace per il trattamento di prima linea dell'HCC in fase avanzata. Quasi tutte, infatti, non hanno superato la fase II dei trial clinici. Solo un farmaco, giunto a questo livello della sperimentazione clinica, si è rivelato migliorare la sopravvivenza in pazienti con HCC avanzato: si tratta del Sorafenib, un inibitore multichinasico orale approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2005 per il trattamento del carcinoma renale avanzato. Dopo questi risultati promettenti, un esteso studio clinico di fase III, lo studio internazionale SHARP, in doppio cieco randomizzato e controllato verso placebo, condotto su 602 pazienti affetti da HCC avanzato, ha evidenziato un miglioramento del 44% nella sopravvivenza dei soggetti trattati con sorafenib (19). La somministrazione di questo farmaco rispetto al placebo ha inoltre rallentato la progressione tumorale. Ciò nonostante, il trattamento farmacologico ha causato nel tempo l'insorgenza di effetti collaterali che si sono manifestati nell'80% dei pazienti trattati con sorafenib contro il 52% dei pazienti trattati con placebo. Complessivamente la sopravvivenza e il tempo di sopravvivenza libero da malattia incrementano mediamente di 3 mesi dopo il trattamento con

sorafenib. Nonostante non ci siano stati casi di risposta completa al farmaco ma solo modeste risposte parziali, questi risultati restano i più promettenti fra quelli finora emersi dai vari studi di terapia molecolare. I dati clinici favorevoli hanno spinto la FDA e l'agenzia europea EMEA ad approvare il sorafenib per il trattamento dei pazienti con HCC in stadio avanzato.

Sorafenib: meccanismo d'azione

Nonostante attualmente il sorafenib rappresenti il farmaco d'elezione utilizzato per il trattamento di prima linea dell'HCC in stadio avanzato, il suo complesso meccanismo d'azione non è ancora completamente noto. Il sorafenib è un farmaco, a basso peso molecolare, che appartiene alla famiglia degli inibitori di chinasi che sono in grado di interferire con il sito attivo di questi enzimi citoplasmatici o dei recettori ad attività tirosina-chinasica, impedendone l'attivazione. In particolare, il sorafenib è un inibitore multichinasico orale che agisce sia a livello dell'epatocita che delle cellule endoteliali che formano i vasi sanguigni del tumore, pertanto è considerato una molecola multi-target in grado di inibire sia la proliferazione delle cellule tumorali sia l'angiogenesi tumorale. Il suo principio attivo, infatti, inibisce le serine/treonine chinasi intracellulari Raf-1 e B-Raf e i recettori espressi sulla superficie cellulare ad attività tirosina-chinasica per il vascular endothelial growth factor (VEGFR 2/3), il recettore β per il platelet-derived growth factor (PDGFR- β), il recettore fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3), c-Kit e il recettore REarranged during Transfection (RET) (20).

La proliferazione e l'angiogenesi, regolate rispettivamente dal pathway Ras/Raf/MEK/ERK e dalla secrezione autocrina/paracrina di VEGF e PDGF sono due processi biologici determinanti per la crescita tumorale. Evidenze sperimentali mostrano come l'espressione e l'attività funzionale (determinata per fosforilazione) di MEK1/2 ed ERK1/2 siano incrementate nel tessuto tumorale epatico piuttosto che nella regione adiacente non tumorale. Questi dati suggeriscono un'attivazione costitutiva di Ras e di Raf a monte del pathway delle MAPK. Tuttavia queste chinasi raramente sono mutate nell'HCC per cui la loro attivazione aberrante non è di natura mutazionale, ma sembra dipendere dal fatto che in circa il 50% degli HCC il gene *Raf-1* è iper-regolato e, di conseguenza, la proteina risulta notevolmente espressa. Inizialmente, il sorafenib è stato riconosciuto come inibitore di Raf-1 e delle forme normali e mutate di B-Raf, ulteriori studi hanno dimostrato che ha anche un'attività anti-angiogenetica.

L'angiogenesi nell'HCC, come in altri tumori solidi, si basa sull'attivazione, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. Queste fasi sono mediate dal legame di fattori angiogenici come VEGF e PDGF, secrete dalle cellule del tumore, con i rispettivi recettori VEGFR2 e PDGFR- β espressi sui periciti e sulle cellule endoteliali. E' stato osservato che il sorafenib esercita un effetto anti-angiogenetico in seguito all'inibizione di recettori ad attività tirosina-chinasica (figura 5) (20).

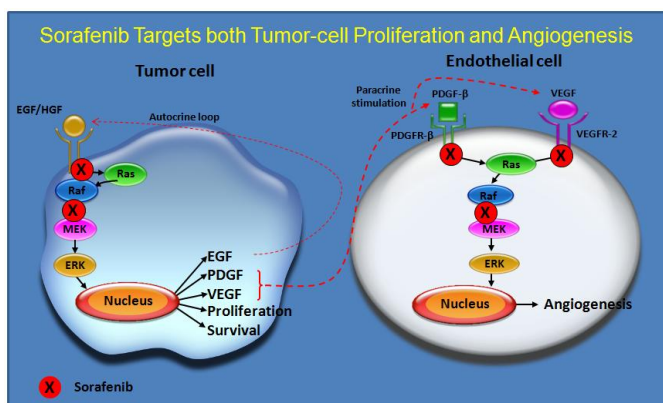


Figura 5. Meccanismo molecolare d'azione del sorafenib.

L'azione del sorafenib si esplica, comunque, anche in maniera Raf/MEK/ERK-indipendente. E' stato visto, infatti, che inducendo l'espressione della proteina MEK1, posta sotto il controllo del promotore della doxyciclina, aumentavano non solo i livelli della proteina MEK-1 ma anche i livelli di fosfo-ERK1/2 sia nelle cellule controllo che in quelle trattate con sorafenib. Nonostante ciò, l'esposizione al sorafenib risultava in un'equivalente induzione di morte cellulare sia in assenza che in presenza di doxyciclina, confermando la presenza di pathway alternativi a quello dipendente da Raf/MEK/ERK coinvolti nel meccanismo d'azione del farmaco (21).

E' stato dimostrato, infatti, che il Sorafenib è in grado di indurre apoptosi in maniera Raf/MEK/ERK-indipendente. La riduzione dell'espressione di Mcl-1 e la defosforilazione di eIF4E da parte di sorafenib in cellule di HCC non correlano, infatti, con l'inattivazione del pathway MEK/ERK (22). Dati simili emergono dal trattamento di cellule leucemiche con sorafenib. Mcl-1 è un membro anti-apoptotico della famiglia Bcl-2 che svolge un ruolo chiave soprattutto nella sopravvivenza delle cellule emopoietiche. La sua traduzione viene marcatamente attenuata in cellule leucemiche trattate con sorafenib, come conseguenza della potente defosforilazione di eIF4E che è un fattore traduzionale di iniziazione. Tuttavia la sola

deregolazione di Mcl-1 è insufficiente per determinare l'apoptosi e, in effetti, dati sperimentali dimostrano che, nel modello leucemico, lo stress del reticolo endoplasmatico fa parte del programma letale MEK/ERK-indipendente indotto dal sorafenib. E' stato osservato, infatti, che il trattamento delle cellule leucemiche con il sorafenib determina una rapida mobilitazione di calcio (Ca) citosolico che favorisce la condizione di stress del reticolo endoplasmatico, e un rapido e sostenuto incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) Ca-dipendente, che agisce come induttore del processo di morte cellulare (23). Il meccanismo attraverso cui il sorafenib sia in grado di indurre stress del reticolo endoplasmatico e, quindi, morte cellulare non è stato ancora completamente chiarito: è noto, però, che molte delle proteine coinvolte nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico sono coinvolte nel processo di epatocarcinogenesi e alcune di esse sembrano svolgere un ruolo chiave nel meccanismo di resistenza delle cellule tumorali al trattamento con sorafenib. In particolare, in uno studio condotto dal gruppo di Shuda, la proteina glucose-related protein-78 (GRP78), coinvolta nella risposta allo stress del RE nel processo noto come unfolded protein response (UPR), è stata identificata come associata alla trasformazione cellulare nell'HCC (24). Il gene *GRP78* codifica per una chaperone molecolare la cui espressione può essere regolata dai fattori trascrizionali ATF6 e XBP1. Un aumento dei livelli di mRNA di GRP78, ATF6 e dello splicing di XBP1, con la sua conseguente attivazione, sono stati osservati nei tumori epatici di più alto grado istologico. L'accumulo di GRP78 nel citoplasma, insieme alla marcata localizzazione nucleare di ATF6 attivato, è stato riscontrato, invece, nei tessuti di HCC moderatamente e scarsamente differenziati (24).

D'altra parte, è stato osservato che alti livelli di espressione di GRP78 conferiscono alle cellule di HCC resistenza al trattamento con sorafenib (25). Il ruolo di questa proteina nell'acquisizione della resistenza al sorafenib è stato determinato usando le cellule HepJ5, che iperesprimono GRP78, e le cellule HepG2 come controllo. In particolare, è stato scoperto che le cellule HepG2 mostrano una sensibilità maggiore al trattamento con sorafenib con una IC50 di 4.8 μ M rispetto alle HepJ5 che presentano una IC50 maggiore di 20 μ M (25). Quando le cellule HepG2 vengono trattate per 24 ore con 20 μ M di sorafenib, più dell'80% delle cellule vanno incontro ad apoptosi contro il 32% delle HepJ5. Allo stesso modo, il knockdown del gene *GRP78* nelle cellule HepJ5, tramite siRNA, aumenta l'efficacia della morte cellulare mediata dal sorafenib. Questi dati hanno dimostrato come GRP78 rappresenti una proteina chiave nel meccanismo di acquisizione della resistenza al sorafenib da parte delle

cellule tumorali epatiche e, per questo motivo, risulta essere un target fondamentale per il superamento della resistenza al trattamento con tale farmaco (25).

Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento farmacologico con sorafenib induce, in cellule tumorali epatiche, l'espressione di diversi geni coinvolti nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico e che questa induzione è ancora più elevata dopo la combinazione con il farmaco anti-infiammatorio celecoxib (26, 27).

Questi dati dimostrano, quindi, che lo stress del reticolo endoplasmatico sembra giocare un ruolo chiave nella risposta delle cellule tumorali al trattamento farmacologico con sorafenib.

Complessivamente, quindi, sono tre gli effetti antitumorali attribuibili al sorafenib e rilevati sperimentalmente: 1) l'inibizione di Raf; 2) l'inibizione dei recettori pro-angiogenetici ad attività tirosina-chinasica; 3) induzione dello stress del reticolo endoplasmatico.

Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER stress)

Il reticolo endoplasmatico è il principale organello intracellulare responsabile del corretto ripiegamento, della traslocazione e delle modifiche post-traduzionali delle proteine. Diversi stimoli fisiopatologici possono determinare l'accumulo di proteine non correttamente ripiegate (misfolded) nel lume del reticolo endoplasmatico, determinando una condizione nota come stress del reticolo endoplasmatico (endoplasmic reticulum stress, ER stress). Per far fronte a questa condizione e ristabilire l'omeostasi cellulare, le cellule attivano una risposta nota come UPR (Unfolded Protein Response). In generale, l'UPR si traduce in un programma trascrizionale e traduzionale di risposta cellulare che culmina in tre eventi fondamentali: 1) l'induzione della trascrizione di geni codificanti per molecole chaperone ed enzimi deputati al folding; 2) l'attenuazione della sintesi proteica; 3) l'avvio alla degradazione delle proteine misfolded (28-33). In particolare, l'UPR determina l'attivazione di tre diversi pathways di trasduzione del segnale mediati da tre sensori molecolari localizzati nella membrana del reticolo endoplasmatico: inositol requiring 1- α (IRE1 α), PKR-like ER kinase (PERK), e activating transcription factor (ATF6 α) (34, 35) (figura 6).

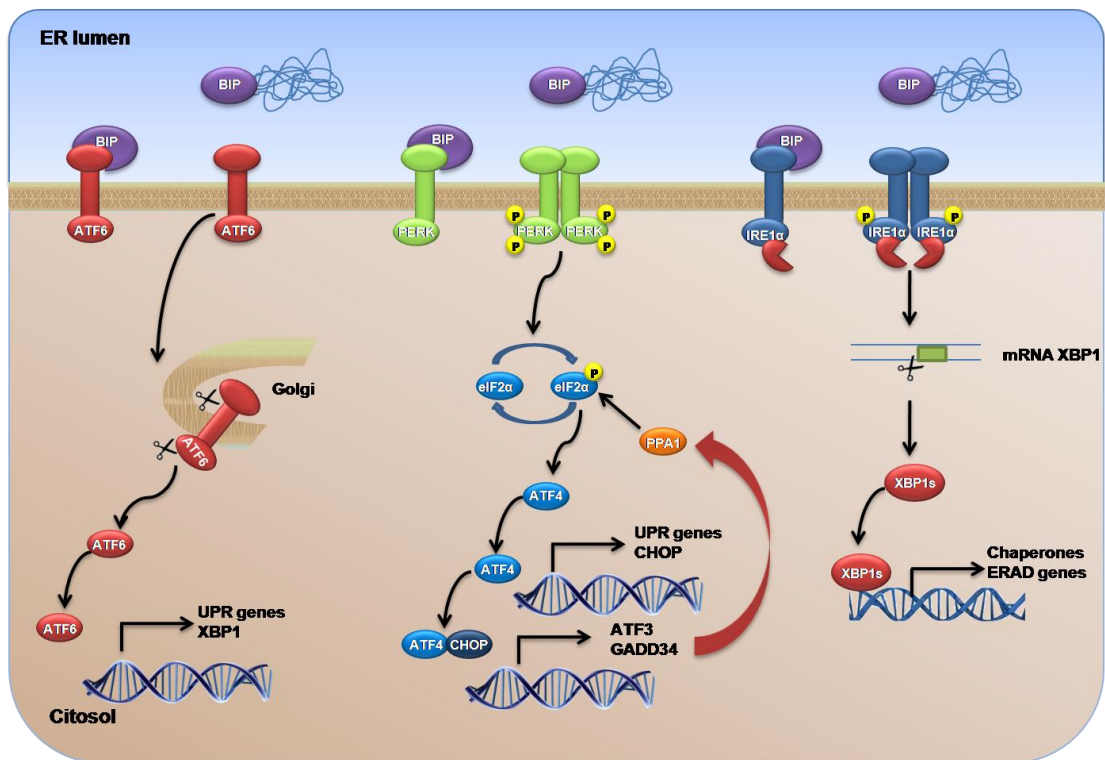


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'unfolded protein response (UPR) che si attiva in risposta allo stress del reticolo endoplasmatico.

In assenza di stress, questi sensori sono mantenuti in uno stato di inattivazione dal legame con una chaperone molecolare nota come GRP78/Bip che rappresenta il regolatore master dell'UPR. In condizioni di stress, l'accumulo di proteine misfolded nel lume del reticolo endoplasmatico, determina un'aumentata richiesta di GRP78/Bip che, quindi, si dissocia da IRE1 α , PERK e ATF6 α , attivandoli (36).

L'attivazione di PERK determina la fosforilazione del fattore eIF-2 α che blocca la traduzione degli mRNA, riducendo così il carico di proteine che giungono all'ER. La fosforilazione di eIF-2 α induce l'espressione di ATF4 che, a sua volta, transattiva geni codificanti per fattori coinvolti nell'UPR, come *CHOP*. CHOP è un fattore pro-apoptotico che induce l'espressione di altri geni pro-apoptotici, e la down-regolazione del fattore anti-apoptotico Bcl-2 (37, 38).

ATF4 e CHOP cooperano per transattivare altri geni codificanti per effettori a valle dell'UPR come *TRB3*, *ATF3* e *GADD34*. Quest'ultimo recluta la proteina fosfatasi 1 che determina la defosforilazione di eIF-2 α per revertire, con un meccanismo a feedback negativo, l'effetto di soppressione della traduzione (39).

IRE1 α è una chinasi con attività endoribonucleasica che si attiva, in seguito alla dissociazione di GRP78, per autofosforilazione. L'attivazione di IRE1 α determina lo splicing alternativo

dell'mRNA specifico per XBP1. Il processo di splicing alternativo dell'mRNA di XBP1 consiste nella rimozione di un introne di 26 paia di basi che determina un frameshift tradizionale che produce la forma attiva della proteina XBP1 (s-XBP1) in grado di agire come attivatore trascrizionale (40). In particolare, s-XBP1 determina la trascrizione di chaperone molecolari, come GRP78 e GRP94, e di geni codificanti per proteine coinvolte nel processo di degradazione, noto come ER-associated degradation (ERAD) (41). Allo stesso tempo, ATF6 è trasportato al Golgi dove il suo dominio citosolico di transattivazione viene tagliato ad opera di specifiche proteasi di membrana (S1P e S2P) e, una volta dopo processamento, trasloca al nucleo dove induce la trascrizione dei suoi geni target, tra i quali *XBPI* (42,43). Insieme ad XBP1, ATF6 promuove la trascrizione di geni target i cui prodotti sono responsabili dell'espansione del reticolo endoplasmatico e incrementano la sua capacità di folding delle proteine per promuovere la sopravvivenza cellulare (44).

L'UPR è, quindi, un meccanismo citoprotettivo che si attiva per ristabilire l'omeostasi intracellulare, in condizioni di stress del reticolo endoplasmatico. Tuttavia, quando la cellula non riesce a bilanciare il misfolding delle proteine accumulate nel lume dell'ER, la prolungata attivazione dell'UPR può determinarne l'apoptosi (36).

ER stress e HCC

Le cellule tumorali sono più dipendenti dall'UPR rispetto alle cellule normali per sopravvivere alle condizioni sfavorevoli che caratterizzano il microambiente tumorale. Tutti e tre i rami di segnalazione dell'UPR risultano essere coinvolti nella tumorigenesi.

Oltre a GRP78, ATF6 e XBP1 la cui iperespressione risulta, come già detto, associata agli HCC di diverso grado istologico (24), anche ATF4 è iperespresso nei tessuti tumorali epatici rispetto ai tessuti sani e sembra svolgere un ruolo chiave nella risposta delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici. E' stato dimostrato, infatti, che il silenziamento genico di ATF4 aumenta gli effetti citotossici del cisplatino in vivo e in vitro, mentre la sua iperespressione riduce la sensibilità delle cellule tumorali epatiche allo stesso trattamento (45).

Allo stesso modo, l'iperespressione di CHOP caratterizza gran parte degli HCC ed è stato dimostrato che esso stesso contribuisce al processo di carcinogenesi epatica, promuovendo l'infiammazione, la fibrosi, la morte cellulare e la proliferazione compensatoria (46, 47).

Questi dati mostrano come i fattori che agiscono nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico siano coinvolti nel processo di carcinogenesi epatica e nel meccanismo di

chemioresistenza delle cellule tumorali epatiche, sia ai trattamenti chemioterapici convenzionali sia al trattamento farmacologico con sorafenib.

L'inibizione di alcuni fattori coinvolti nel meccanismo dell'ER stress potrebbe essere un target fondamentale per il superamento della resistenza tumorale ai trattamenti farmacologici.

Nupr1/p8 e cancro

La Nuclear Protein 1 (Nupr1), nota anche come p8, è una piccola proteina altamente basica, la cui espressione è indotta in diverse condizioni di stress. Inizialmente, il gene che codifica per Nupr1/p8 è stato identificato, perché iperespresso, nel pancreas di ratti in fase di pancreatite acuta (48). L'mRNA codificante per Nupr1/p8 è lungo circa 600 nucleotidi e codifica per una proteina di 82 aminoacidi con una massa teorica di circa 8 kDa. Il suo coinvolgimento nel processo carcinogenetico è stato inizialmente suggerito dall'evidenza che questa proteina risulta iperespressa in differenti forme di tumore maligno e nelle metastasi di cancro mammario (49-55). Studi successivi hanno mostrato che, in base al contesto cellulare e/o al tipo di stress cui una cellula viene sottoposta, Nupr1/p8 è in grado di agire sia come induttore che come soppressore della crescita tumorale, regolando positivamente la progressione attraverso il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'autofagia e la trascrizione genica di diversi target: le sue funzioni pleiotropiche dipendono dai partner molecolari con cui interagisce, dalla sua localizzazione sub-cellulare e dal suo livello di espressione intracellulare (56).

In particolare, è stato dimostrato che Nupr1/p8 è in grado di regolare la progressione del ciclo cellulare mediando la degradazione dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, p27 (57). Il meccanismo attraverso cui Nupr1/p8 determina la degradazione di p27 prevede la sua interazione con jab1 (jun-activating binding protein 1): Nupr1/p8 è, infatti, necessario a jab1 per mediare la traslocazione di p27 dal nucleo al citoplasma, dove questo viene degradato (57) (figura 7).

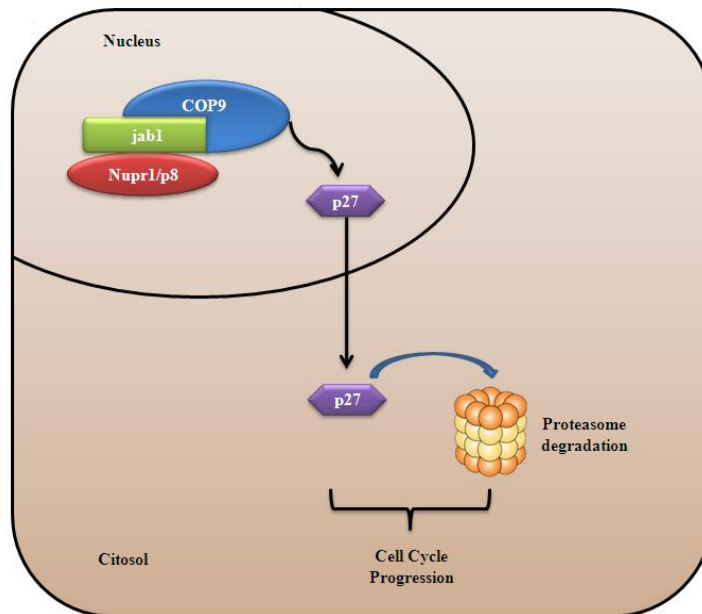


Figura 7. Nupr1/p8 regola la progressione del ciclo cellulare attraverso l'interazione con il fattore Jab1 e la conseguente degradazione proteasoma-dipendente di p27.

Inoltre, in diversi modelli tumorali, un aumentato del livello intracellulare di Nupr1/p8 sembra essere associato con l'induzione dell'apoptosi (53). Tuttavia il ruolo di Nupr1/p8 nella regolazione del processo apoptotico è complesso e poco chiaro in quanto fortemente dipendente dal contesto cellulare. In cellule di tumore pancreatico e mammario, ad esempio, l'espressione di Nupr1/p8 risulta essere inversamente correlata all'apoptosi (58, 59).

Studi di biofisica hanno dimostrato che, per inibire l'apoptosi, Nupr1/p8 interagisce con la protimosina- α formando un complesso eterodimerico stabile che è in grado di inibire l'eptamerizzazione del complesso Apaf-1/citocromo C che si forma in risposta a stimoli pro-apoptotici (60) (figura 8).

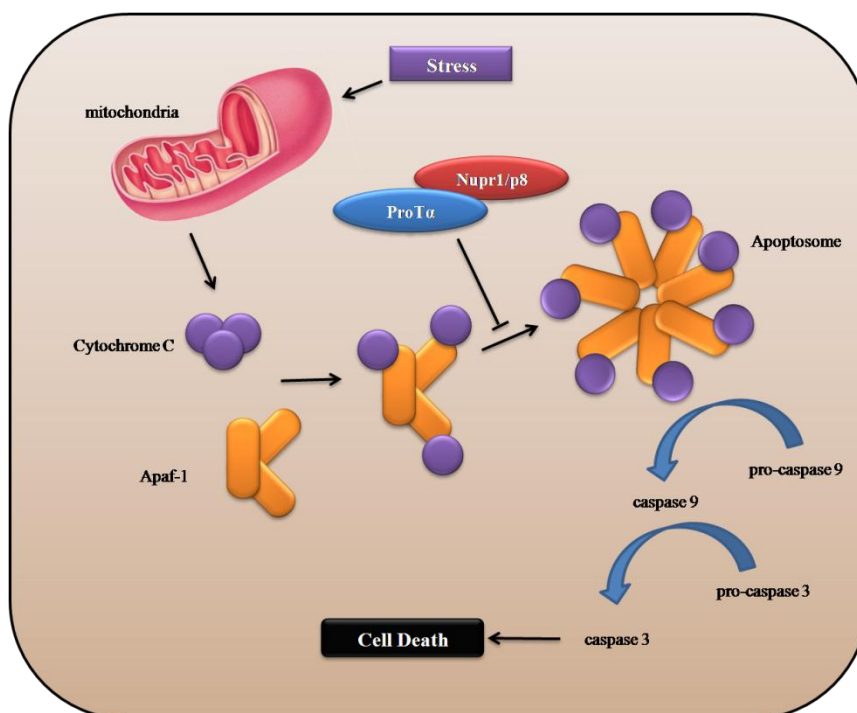


Figura 8. Nupr1/p8 in seguito all'interazione con Protimosina α (ProT α) induce apoptosi inibendo la formazione dell'apoptosoma.

In cellule cardiache, inoltre, Nupr1/p8 è in grado di inibire l'autofagia mediando la traslocazione citoplasmatica del fattore trascrizionale FoxC3 e, quindi, inibendo la sua capacità di indurre l'espressione del fattore pro-autofagico bnip3 (61).

D'altra parte, nel modello di tumore pancreatico, è stato dimostrato che il trattamento con il 9-tetraidro-cannabinolo (THC) determina un incremento del livello di espressione di Nupr1/p8 e di tre dei suoi geni target *ATF4*, *CHOP* e *TRB3* coinvolti nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico, mediando l'effetto citotossico del THC e inducendo la morte cellulare per apoptosi (62). Studi successivi, condotti sullo stesso modello tumorale, hanno evidenziato che, in condizioni di deprivazione di nutrienti (starvation), Nupr1/p8 è in grado di regolare, attraverso l'induzione dell'espressione genica di RelB, il fattore anti-apoptotico IER3 che rappresenta un componente chiave del pathway non-canonico di NF- κ B. Il pathway Nupr1/p8/RelB/IER3 promuove, quindi, la sopravvivenza delle cellule tumorali pancreatiche inibendo l'apoptosi starvation-dipendente (63) (figura 9).

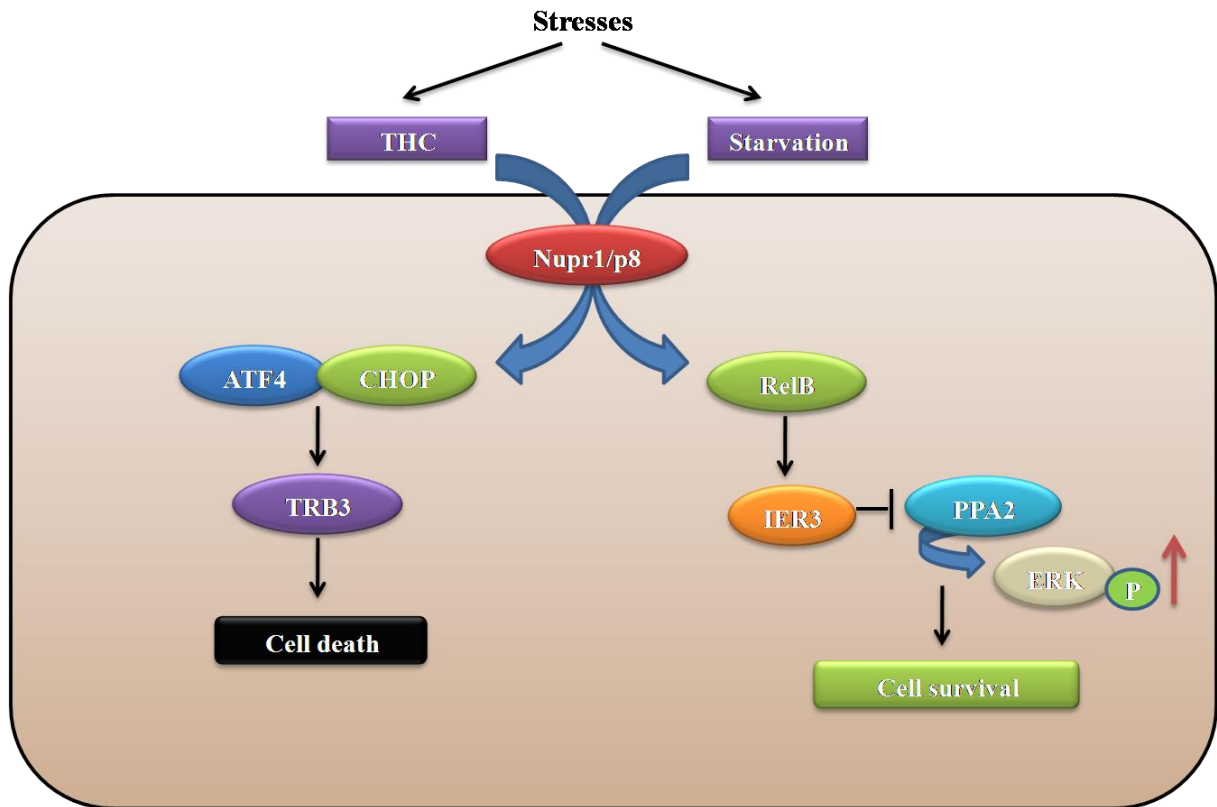


Figura 9. Nelle cellule tumorali pancreatiche, Nupr1/p8 è in grado di agire come induttore o soppressore della crescita tumorale a seconda del tipo di stress cui le cellule vengono esposte.

Inoltre, è stato osservato che Nupr1/p8 rappresenta un fattore di resistenza al trattamento con gemcitabina ed è responsabile, mediante l'induzione della traslocazione citoplasmatica di p21, della resistenza di cellule di tumore mammario al trattamento farmacologico con doxorubicina (64, 65).

Questi dati mostrano come, in uno stesso modello tumorale, quello del tumore pancreatico, Nupr1/p8 possa mediare effetti diametralmente opposti, agendo da soppressore o induttore della crescita tumorale a seconda del tipo di stress cui la cellula viene esposta.

Nupr1/p8 è responsabile quindi di diversi processi che si attivano, all'interno delle cellule, in condizioni fisiologiche e patologiche. Nel fegato, questa proteina rappresenta un importante elemento di risposta allo stress. E' stato, infatti, osservato che l'espressione di Nupr1/p8 protegge il fegato dal danno epatico indotto dalla somministrazione di tetracloruro di carbonio (CCl₄) attraverso la regolazione dell'espressione genica del complesso enzimatico CYP2E1 e che la sua inibizione aumenta gli effetti tossici del trattamento con CCl₄ (66). E' noto che la tossicità del CCl₄ è mediata da alcuni suoi derivati citotossici prodotti in seguito alla sua conversione ad opera dell'enzima CYP2E1. L'espressione di questo enzima è inibita nelle

prime ore successive al trattamento con CCl_4 come parte di un meccanismo cellulare di auto-difesa. E' stato, invece, osservato che il silenziamento di Nupr1/p8 ritarda la riduzione dell'espressione del complesso enzimatico CYP2E1 in topi Nupr1/p8^{-/-}, favorendo l'accumulo dei derivati tossici del CCl_4 (66). Inoltre, in topi Acyl-CoA Oxidase 1^{-/-} (ACOX^{-/-}), un modello di steatoepatite, l'iper-espressione di Nupr1/p8 e dei suoi geni target *ATF4* e *TRB3*, così come la fosforilazione del fattore trascrizionale eIF2 α , inducono l'apoptosi e la successiva rigenerazione delle cellule epatiche favorendo, così, il processo di epatocarcinogenesi (67).

OBIETTIVI DELLA TESI

Nonostante attualmente il sorafenib rappresenti il farmaco d'elezione utilizzato per il trattamento dei pazienti affetti da HCC in stadio avanzato, il suo complesso meccanismo d'azione non è stato ancora completamente chiarito. E' noto che il sorafenib è un inibitore multichinasico orale che agisce inibendo il pathway di Raf/MEK/ERK bloccando sia la proliferazione cellulare che la neoangiogenesi tumorale, tuttavia diversi studi hanno dimostrato che il sorafenib è in grado di agire anche in maniera MEK/ERK-indipendente, determinando morte cellulare attraverso l'induzione del pathway dello stress del reticolo endoplasmatico. Pare, dunque, che lo stress del reticolo endoplasmatico faccia parte del programma letale MEK/ERK-indipendente indotto dal sorafenib.

Tra le proteine dello stress, un ruolo importante sembra essere svolto dalla nuclear protein 1/p8 (Nupr1/p8) che è stata ritrovata iperespressa in diversi tipi di tumori umani e, in particolare, nelle forme avanzate e metastatiche di tumore pancreatico. In questa forma tumorale, Nupr1/p8 sembra giocare un ruolo chiave nell'adattamento delle cellule tumorali alle condizioni di stress indotte da chemioterapici, favorendo la crescita del tumore primario e l'impianto delle cellule tumorali in tessuti secondari (55). Per questo motivo, Nupr1/p8 rappresenta un promettente target terapeutico e un fattore predittivo del potenziale metastatico di questa forma tumorale. Tuttavia il ruolo di Nupr1/p8 nell'HCC non è stato ancora definito così come non è stato ancora chiarito il suo ruolo nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib.

Alla luce di queste osservazioni, gli obiettivi della mia tesi di dottorato sono stati quelli di analizzare:

- l'effetto del trattamento farmacologico con sorafenib sulla vitalità cellulare di quattro linee cellulari umane di epatocarcinoma con caratteristiche genetiche differenti;
- l'effetto del trattamento farmacologico con sorafenib sull'induzione dell'espressione dei geni coinvolti nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico e, in particolare, sull'induzione dell'espressione genica di Nupr1/p8;
- il possibile coinvolgimento Nupr1/p8 nel processo di epatocarcinogenesi e nella resistenza ai trattamenti farmacologici con sorafenib e con doxorubicina;
- i meccanismi di azione di Nupr1/p8 nell'HCC e i suoi target molecolari allo scopo di identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici per il trattamento di questa forma tumorale.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Il sorafenib è stato acquistato dalla Alexis Biochemicals. Il composto è stato solubilizzato in dimethyl sulfoxide (DMSO) e diluito per gli studi in vitro in RPMI 1640 alle concentrazioni desiderate, con una concentrazione finale di DMSO mai superiore allo 0.1%. Il DMSO 0.1% è stato aggiunto alle cellule come solvente controllo.

La doxorubicina è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia), è stata solubilizzata in PBS e diluita in RPMI 1640 alle concentrazioni desiderate.

Linee cellulari e colture cellulari

Gli studi in vitro sono stati condotti su quattro linee cellulari umane di epatocarcinoma con caratteristiche genetiche differenti (HepG2, Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5). Le cellule sono state mantenute in RPMI 1640 supplementato con 1 mM glutammina (Sigma-Aldrich), 1 mM sodio piruvato, 10% siero bovino fetale (FCS) della Gibco e antibiotici (penicillina, streptomycin della Sigma-Aldrich), a 37°C al 5% di CO₂.

Estrazione di RNA ed analisi di RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule impiegando una metodica che fa uso del TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Milano, Italia). Per valutare gli effetti dose-dipendenti del trattamento con sorafenib sull'espressione di alcuni geni dello stress dell'ER, le cellule sono state piastrate in concentrazione di 5×10^5 /pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di sorafenib (2.5 – 5 – 7.5 – 10 – 15 μ M). Le cellule controllo sono state trattate con 0.1% di DMSO. Dopo 24 ore di trattamento, l'RNA è stato estratto con 500 μ l/pozzetto di TRIzol secondo il protocollo della Invitrogen. Per studiare gli effetti tempo-dipendenti del trattamento farmacologico del sorafenib sull'espressione di alcuni geni dello stress dell'ER, le cellule sono state piastrate in concentrazione di 5.0×10^5 /pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate con una dose fissa (7.5 μ M) di sorafenib per 3-6-12-24-48 ore. Ad ogni tempo di trattamento, l'RNA totale è stato estratto con 500 μ l/pozzetto di TRIzol seguendo il protocollo della Invitrogen.

1.5 μ g di RNA totale sono stati usati per sintetizzare i cDNA, mediante retro-trascrizione. L'RNA è stato incubato per 50 min a 42°C in presenza dell'enzima trascrittasi inversa (MML-V), dei precursori deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP) e di oligo dT. I cDNA ottenuti sono

stati amplificati mediante metodica standard di PCR per analizzare i livelli di espressione dei geni coinvolti nel pathway dello stress dell'ER usando, primers specifici (Tabella 1). L'espressione dell'mRNA della β -actina è stata utilizzata come controllo interno per la quantizzazione. Aliquote dei prodotti di PCR sono state frazionate in gel di agarosio 1.6% contenente GelRed Nucleic Acid Stain, visualizzate e successivamente quantificate mediante scansione densitometrica utilizzando lo strumento ChemiDoc (Bio-Rad) e il software QuantityOne.

Primers	Primer Forward	Primer Reverse
Nupr1/p8	GAAGAGAGGCAGGGAAGACA	CTGCCGTGCGTGTCTCTATTTA
TRB3	GCCACTGCCTCCCGTCTTG	GCTGCCTTGCCCGAGTATGA
ATF4	AGTCGGGTTTGGGGGCTGAAG	TGGGGAAGGGGAAGAGGTTGTAA
CHOP	ATGGCAGCTGAGTCATTGCC	TCATGCTTGGTGCAGCAGATTC
XBPI	CCTTGTA GTTGAGAACCAGG	GGGGCTTGGTATATATGTGG
β-actina	CACCACACCTCCTACAATGAGC	GAGGATCTTCATGAGGTAGTAGTCATCAGTC

Tabella 1. La tabella mostra le sequenze 3'-5' dei primers utilizzati per le reazioni di RT-PCR.

Saggi MTS

I saggi MTS sono stati condotti per valutare l'effetto del trattamento farmacologico con sorafenib sulla vitalità cellulare. Le cellule sono state coltivate ad una concentrazione di 5.0×10^3 /pozzetto in piastre a 96 pozzetti e incubate per 24 ore a 37°C al 5% di CO₂.

Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di sorafenib in DMSO 0.1%. Dopo 24, 48 o 72 ore di trattamento sono stati aggiunti, direttamente nel mezzo di coltura, 16 μ l di MTS (Promega, Milano, Italia).

L'MTS è un composto che viene metabolizzato dalle cellule metabolicamente attive e ridotto in un prodotto colorato (formazano) solubile nel mezzo di coltura. La reazione viene lasciata sviluppare per un periodo variabile da 1 a 2 ore. Successivamente le piastre sono state lette con un lettore di piastre a 490 nm. La citotossicità viene espressa come percentuale rispetto all'assorbanza misurata nelle cellule controllo e fissata uguale a 100. I valori sono stati espressi come media delle percentuali \pm DS di almeno due esperimenti condotti in triplicato.

Immunofluorescenza

Le cellule sono state piastrate a concentrazione di 1.0×10^4 /pozzetto in chamber slides in RPMI completo e incubate a 37 °C al 5% di CO₂. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate

con diverse concentrazioni di sorafenib (10-20-30 μ M) per 3-6 ore. Al termine del trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 3.7% per 15 min a temperatura (T) ambiente e lavate con PBS. La permeabilizzazione della membrana plasmatica è stata effettuata aggiungendo 0.2% di Triton X-100 in PBS per 5 min a T ambiente ed è stata seguita da 3 lavaggi in PBS per 5 min.

Le cellule così fissate e permeabilizzate sono state incubate per 10 min con una soluzione 3% BSA in PBS a T ambiente. Successivamente, è stato aggiunto l'anticorpo primario policlonale anti-Nupr1/p8 (gentilmente fornitoci dal Dr. Juan Lucio Iovanna, INSERM Marsiglia, Francia) diluito 1:200 in 1% BSA in PBS e le cellule sono state incubate per 1 ora e 30 min a T ambiente in camera umida. Al termine dell'incubazione, sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario fluoresceinato (AlexaFluor goat 488 anti-rabbit) diluito 1:500 in 1% BSA in PBS. Sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS e dopo l'aggiunta del "mounting medium" Vectashield diluito 1:3 con DAPI, i vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

Silenziamento genico mediante siRNA

Il siRNA specifico per il gene umano Nupr1/p8 e il siRNA negative control (NC) sono stati acquistati dalla Qiagen (Milano, Italia). I siRNA specifici per i geni umani *RelB* e *IER3* sono stati acquistati dalla Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Tutti i siRNA sono stati utilizzati ad una concentrazione finale di 75 nM.

Le cellule (Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5) sono state piastrate in RPMI 1640 al 10% di FCS senza antibiotici e incubate a 37°C al 5% CO₂ ad una densità tale da raggiungere in 24 ore il 50-70% di confluenza. Il giorno successivo, le cellule sono state trasfettate utilizzando la Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen), seguendo il protocollo del produttore. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state staccate con Tripsina-EDTA per 5 min a 37°C e piastrate a differenti concentrazioni per i saggi funzionali.

Colony Assay

Il colony assay è stato condotto per valutare il possibile ruolo di Nupr1/p8, RelB e IER3 nel controllo della capacità clonogenica delle cellule di HCC. In particolare, cellule trasfettate con i siRNA specifici per Nupr1/p8, RelB e IER3 e cellule controllo trasfettate con il siRNA NC sono state piastrate alla concentrazione di 1×10^3 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Le

cellule sono state incubate a 37°C al 5% di CO₂ per 14 giorni. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 72 ore.

Dopo 14 giorni, è stato rimosso il terreno di coltura, sono stati effettuati due lavaggi con PBS e le cellule sono state fissate con etanolo freddo al 70% per 20 minuti in ghiaccio. Successivamente è stato rimosso l'etanolo, sono stati effettuati due lavaggi con PBS e le colonie sono state colorate per 5 min aggiungendo 500 µl a pozzetto di crystal violetto 0.1%. Infine, l'eccesso di colorante è stato rimosso facendo due lavaggi con acqua e le colonie sono state contate al microscopio. I risultati sono stati espressi come percentuale, considerando come 100% le colonie formate dalle cellule trasfettate con il siRNA NC. I valori ottenuti sono stati espressi come medie delle percentuali \pm DS di almeno due esperimenti condotti in doppio.

Trasfezione stabile mediante shRNA specifico per Nupr1/p8

Per gli esperimenti di silenziamento stabile è stata scelta la linea cellulare Hep3B che mostra il livello più alto di espressione basale del messaggero specifico per Nupr1/p8 tra tutte le linee cellulari da noi utilizzate. Nelle cellule Hep3B, il gene endogeno codificante per Nupr1/p8 è stato silenziato utilizzando un shRNA specifico, indicato come sh9495. Il controllo è rappresentato da cellule trasfettate con un vettore vuoto, indicato come pSilencer, contenente una sequenza aspecifica che non influenza l'espressione di nessun gene. Entrambi i plasmidi, sh9495 e pSilencer, sono stati sviluppati grazie alla collaborazione con il Prof. Dimcho Bachvarov dell'University of Laval, Quebec, Canada. Le cellule sono state trasfettate utilizzando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) secondo il protocollo del produttore, e mantenute in terreno completo contenente 2 µg/ml di puromicina per la selezione dei cloni stabili.

Studio della vitalità cellulare

La proliferazione (cell index) delle cellule Hep3B sh9495 e delle cellule controllo pSilencer è stata studiata in tempo reale utilizzando il sistema Cell Analyzer xCELLigence (RTCA) seguendo le istruzioni del fornitore (Roche Applied Science e ACEA Biosciences). Questi esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Bachvarov. In particolare, il sistema xCELLigence è costituito da quattro componenti principali: l'analizzatore RTCA, la stazione RTCA DP, il computer RTCA con un software integrato e delle particolari piastre a 16 pozzetti (E-plate 16). Le cellule sono state seminate in triplicato a 2×10^4 cellule/ pozzetto

nelle E -Plate 16 , una speciale piastra a 16 pozzetti collegata con lo strumento RTCA. Ciascuno dei 16 pozzetti sulla E -Plate 16 contiene una matrice di elettrodi con sensore integrato, in modo che le cellule all'interno di ogni pozzetto possano essere monitorate e contate in tempo reale . La crescita delle cellule è stata monitorata per 25 ore.

Conte di vitalità

I cloni stabili ottenuti dalla trasfezione con shRNA sono stati utilizzati per studiare il ruolo di Nupr1/p8 nella proliferazione cellulare e nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib e con un chemioterapico convenzionale, come la doxorubicina . In particolare, cellule stabilmente silenziante per Nupr1/p8 (indicate come Hep3B sh9495) e cellule controllo (indicate come Hep3B pSilencer) sono state piastrate in petri da 35 mm alla concentrazione di 1×10^5 e incubate a 37°C al 5% di CO₂. La crescita cellulare è stata studiata mediante conte di vitalità effettuate con l'utilizzo del Trypan Blue dopo 1, 3 e 6 giorni di incubazione.

Le curve di crescita ottenute sono il risultato delle medie \pm DS di due esperimenti condotti in doppio.

Allo stesso modo è stato valutato l'effetto del trattamento farmacologico con sorafenib o con doxorubicina sulla vitalità cellulare. In particolare, le cellule Hep3B sh9495 e pSilencer sono state piastrate ad una concentrazione di 1×10^5 in petri da 35 mm e incubate a 37 °C al 5% di CO₂. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di sorafenib (7.5-10 μ M) e doxorubicina (0.25-0.5 μ M). Dopo 48 ore di trattamento, l'effetto dei trattamenti farmacologici sui due cloni stabili è stato valutato mediante conte di vitalità cellulare effettuate con l'uso del Trypan Blue. I dati ottenuti sono stati riportati come media \pm DS di almeno due esperimenti condotti in doppio.

Analisi Real-Time PCR

L'analisi quantitativa di real-time PCR è stata condotta per valutare il livello di espressione del trascritto Nupr1/p8 e di alcuni dei suoi geni target, in cellule Hep3B sh9495 stabilmente silenziate e in cellule pSilencer. I primers specifici per Nupr1/p8, RelB, IER3, TRB3 sono stati acquistati dalla Qiagen (Tabella 2).

Primers	Cat N°
Nupr1/p8	QT00088382
RelB	QT00038640
IER3	QT00203350
TRB3	QT00088543
β-actina	QT00095431

Tabella 2. Primer utilizzati per l'analisi qPCR

La reazione è stata condotta utilizzando il seguente programma: 1 ciclo di attivazione a 94°C per 15 min, 40 cicli a 95 °C per 15 sec, 60°C per 30 sec e 72°C per 30 sec. L'espressione relativa di ogni gene nelle cellule stabilmente silenziate con sh9495 è stata calcolata usando il metodo comparativo del C_t , in cui l'espressione del gene di interesse viene espressa in termini di numero di volte di induzione rispetto al controllo (pSilencer). I dati ottenuti sono stati corretti con il livello di espressione quantitativo della β-actina.

Western Blot

I lisati cellulari delle cellule Hep3B sh9495 e pSilencer sono stati ottenuti utilizzando il Ripa Buffer (Cell Signaling Technologies, Danvers MA). Le cellule sono state lisate in ghiaccio per 20 min. Il lisato è stato successivamente centrifugato a 10,000 rpm per 20 min a 4°C. Il supernatante è stato utilizzato per la determinazione delle proteine usando il kit "Protein Assay" della Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Srl, Milano, Italia) ed usando come proteina standard la siero albumina bovina (BSA). Dopo la quantizzazione, 30 µg di estratti proteici per RelB (Cell Signaling Technologies) e p42/44 (totale e fosforilato) (Cell Signaling Technologies), e 5 µg per la β-actina (Sigma Aldrich) sono stati denaturati per 5 min a 100 °C e separati su un gel di SDS-poliacrilammide al 10% in condizioni denaturanti. Le proteine sono state successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa (LI-COR Biosciences) utilizzando un sistema trans-blot (Bio-Rad Laboratories Srl, Milan, Italy). Dopo il trasferimento le membrane sono state bloccate con una soluzione di Blocking Buffer (Licor Odyssey) 1:1 con TBS (tris-saline buffer) overnight. Il giorno successivo, le membrane sono state incubate con i vari anticorpi primari diluiti in una soluzione di blocking buffer 1:1 con TBST (TBS 0.2% tween 20) per 1 h a T ambiente. L'anticorpo anti-β-actina è stato diluito

1:25000 mentre tutti gli altri anticorpi sono stati diluiti 1:1000. Successivamente, sono stati effettuati 3 lavaggi in TBST 0.1% per 10 min a T ambiente in agitazione. Infine, le membrane sono state incubate con gli anticorpi secondari per 1 h a T ambiente. L'anticorpo anti-mouse è stato diluito 1:5000 in una soluzione di blocking buffer 1:1 con TBST 0.2% mentre l'anticorpo anti-rabbit è stato utilizzato ad una diluizione 1:2000. Dopo l'incubazione, sono stati effettuati 3 lavaggi in TBST 0.1% per 10 min in agitazione e le membrane sono state sviluppate con il sistema di rilevazione a infrarossi Odyssey.

La reazione si basa su una reazione di emissione di fluorescenza da parte dell'anticorpo secondario utilizzato, che viene rilevata ed acquisita da uno scanner ed elaborata utilizzando uno specifico software.

Saggio di migrazione “transwell”

La capacità di migrazione delle cellule Hep3B stabilmente trasfettate con sh9495 e con pSilencer è stata valutata utilizzando camere di coltura “transwell” (NUNC) contenenti membrane porose con pori di 8 micrometri (figura 9). 2.5×10^4 cellule sono state piastrate in RPMI 1640 senza siero fetale in corrispondenza della camera superiore, mentre la parte inferiore della camera è stata riempita con terreno di coltura RPMI 1640 contenente il 20% di siero fetale.

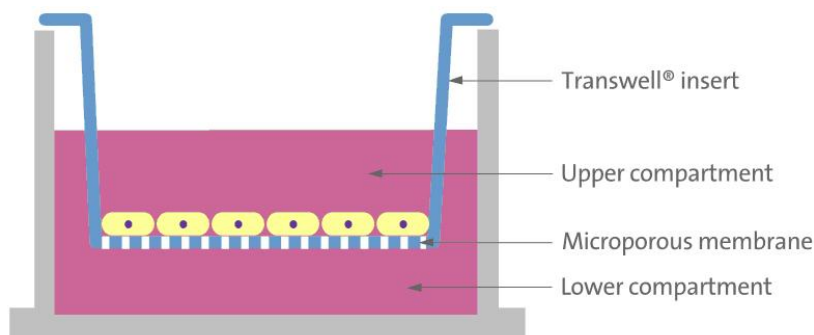


Figura 9. Struttura del transwell utilizzato per i saggi di migrazione cellulare

Dopo 48 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO₂, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7% e colorate con Crystal violetto allo 0.1%. Le cellule non migrate rimaste adese nella parte superiore della camera di migrazione sono state rimosse mediante l'utilizzo di un cotton fioc. Le cellule migrate, presenti nella parte inferiore della camera di migrazione sono state, quindi, contate al microscopio. I risultati delle conte sono stati espressi come percento rispetto al controllo (pari al 100%) rappresentato dalle cellule trasfettate con il

vettore pSilencer. I dati ottenuti sono stati riportati come la media delle percentuali \pm DS di almeno due esperimenti condotti in doppio.

Saggio di invasività

L'invasività delle cellule Hep3B sh9495, stabilmente silenziate per Nupr1/p8, è stata valutata mediante saggi "Matrigel" in cui si utilizzano camere transwell in cui la membrana è rivestita da uno strato di matrigel (BD Sciences). Anche in questo caso, le cellule Hep3B sh9495 e le cellule controllo pSilencer sono state piastrate in RPMI 1640 senza siero fetale in corrispondenza della camera superiore, mentre la parte inferiore della camera è stata riempita con terreno di coltura RPMI 1640 contenente il 20% di siero fetale. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO₂, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 3.7% e colorate con Crystal violetto allo 0.1%. Le cellule migrate presenti sul versante inferiore della membrana sono state contate al microscopio. I risultati delle conte sono stati espressi come percento rispetto al controllo (100%) rappresentato dalle cellule trasfettate con il vettore pSilencer. I dati ottenuti sono stati riportati come la media delle percentuali \pm DS di almeno due esperimenti condotti in doppio.

Esperimento "in vivo", modello dello xenograft

8 topi nudi CJ57BL di 6 settimane sono stati utilizzati per condurre esperimenti di xenograft allo scopo di valutare il differente grado di tumorigenicità delle cellule stabilmente silenziate per Nupr1/p8 e delle cellule controllo stabilmente trasfettate con un vettore vuoto. 1.2×10^6 cellule silenziate e cellule controllo sono state inoculate in corrispondenza dei fianchi sinistro e destro, rispettivamente, di ciascun animale. Dopo 4 settimane, i topi sono stati sacrificati e sono state valutate le dimensioni dei tumori.

Anali di espressione genica globale mediante DNA Microarray

L'analisi dei cambiamenti dell'espressione genica globale in cellule Hep3B stabilmente trasfettate con shNupr1/p8 è stata condotta tramite DNA microarray. Utilizzando la tecnologia Agilent e il software GeneSpring è stata generata una lista di geni che risultano indotti o inibiti in seguito al silenziamento stabile di Nupr1/p8. L'analisi dei pathway e dei network in cui questi geni sono coinvolti è stata effettuata utilizzando il software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). In dettaglio, 0,5 μ g di RNA totale estratto dalle cellule Hep3B

sh9495 e dalle Hep3B pSilencer sono stati utilizzati per sintetizzare i corrispondenti cDNA marcati fluorescenti, usando un kit di amplificazione lineare fluorescente (Agilent) e 10 mM di dCTP marcati con cianina 3 e 5 (Perkin-Elmer, Boston, MA). I cDNA marcati con le due differenti cianine sono stati, in seguito, purificati utilizzando il kit di purificazione “RNeasy mini kit” (Qiagen) e aggiunti alla piattaforma Agilent Whole Genome Oligonucleotide Microarray, contenente circa 44,000 geni umani, per studiare le differenze nell’espressione genica.

Per validare i dati ottenuti dai microarray è stata condotta un’analisi quantitativa mediante Real-time PCR, in cellule Hep3B sh9495 e cellule Hep3B pSilencer. I primers specifici per Nupr1, Runx2, Cry-2, KLF4 e TP63 sono stati acquistati dalla Qiagen. L’espressione relativa di ogni gene nelle cellule stabilmente silenziate con sh9495 è stata calcolata usando il metodo comparativo del Ct, in cui l’espressione del gene di interesse viene espressa in termini di numero di volte di induzione rispetto al controllo (pSilencer). I dati ottenuti sono stati corretti con il livello di espressione quantitativo della β -actina.

Colorazione con Oil Red

1.0×10^5 cellule Hep3B sh9495 (stabilmente silenziate per Nupr1/p8) e cellule Hep3BpSilencer sono state coltivate in piastre da 12 pozzetti in RPMI completo al 5% di siero e incubate a 37°C al 5% di CO₂. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di acido oleico (0.1-0.2-0.5 mM) coniugato con BSA. 24 ore dopo il trattamento è stato rimosso il terreno, sono stati fatti due lavaggi con PBS e le cellule sono state fissate overnight con formalina al 10% in PBS. Successivamente è stata rimossa la formalina, sono stati fatti due lavaggi con acqua e sono stati aggiunti 100 μ l di Oil Red O staining (1-([4(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol) (Sigma-Aldrich) ad ogni pozzetto e le cellule sono state incubate per 30 minuti a T ambiente. A questo punto, è stato rimosso l’Oil Red e, dopo due lavaggi con acqua, il colorante è stato eluito aggiungendo ad ogni pozzetto 100 μ l di isopropanolo al 100%. Il colorante eluito è stato letto allo spettrofotometro ad una lunghezza d’onda di 550 nm. Le letture ottenute sono state normalizzate per il numero di cellule presenti nei pozzetti dopo trattamento con le diverse concentrazioni di acido oleico. Per questo motivo, le cellule sono state colorate con Crystal violetto per 10 min a T ambiente e, dopo due lavaggi con acqua, il colorante è stato eluito utilizzando acido acetico al 33%. Il colorante eluito è stato letto ad una lunghezza d’onda di 500 nm. I dati ottenuti sono stati espressi in grafico

come rapporto delle letture 550 nm/500 nm, riportando come 1 il rapporto 550/500 relativo al controllo rappresentato dalle cellule trattate soltanto con BSA. I valori ottenuti sono stati espressi come medie \pm DS di almeno due esperimenti condotti in triplicato.

Colorazione con Bodipy

2×10^4 cellule HepG2 sono state coltivate in chamber slide da 8 pozzetti in RPMI completo al 5% di siero e incubate per 24 ore a 37°C al 5% di CO₂. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con dosi crescenti di acido palmitico (0.1 – 0.2 – 0.5 mM) coniugato con BSA. 24 ore dopo il trattamento, è stato rimosso il terreno, sono stati fatti due lavaggi in PBS e le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7% in BSA per 20 min a T ambiente. Successivamente è stata rimossa la paraformaldeide, sono stati fatti due lavaggi con PBS e sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di Bodipy (Sigma-Aldrich) 10 µg/ml per 10 min a T ambiente. Il Bodipy (1,3,5,7-Tetramethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene) è un colorante fluorescente in grado di colorare le goccioline lipidiche che si formano all'interno delle cellule dopo il trattamento con acidi grassi. Rimosso il colorante, sono stati fatti due lavaggi in PBS e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza. Per valutare il possibile coinvolgimento di Nupr1/p8 nell'accumulo di goccioline lipidiche dopo il trattamento con acido palmitico, è stato estratto l'RNA da cellule HepG2 trattate con 0.5 mM di acido palmitico per 3, 6 e 18 ore ed è stato valutato il livello di espressione del gene *Nupr1/p8* e di alcuni dei suoi geni target, mediante Real-Time PCR.

Pazienti

I campioni tumorali e i tessuti epatici sani tissutali sono stati ottenuti, previo consenso informato, da pazienti affetti da HCC e da pazienti sani sottoposti ad intervento di colecistectomia. I resecati chirurgici sono stati utilizzati per ottenere estratti di RNA da utilizzare per l'analisi quantitativa, mediante Real-Time PCR, del livello di espressione di Nupr1/p8 nei campioni tumorali rispetto ai tessuti epatici sani. I risultati ottenuti sono stati espressi in termini di numero di volte di induzione rispetto al controllo (rappresentato dalla media degli RQ dei tessuti epatici sani) e corretti in base ai livelli di espressione quantitativi della β -actina.

Analisi immunoistochimica

I campioni tissutali sono stati ottenuti , previo consenso informato, da pazienti affetti da HCC, da pazienti affetti da NASH e da pazienti sani sottoposti ad interventi di colecistectomia. I resecati chirurgici sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina. Sezioni di spessore di 4 μ m sono state raccolte su vetrini rivestiti con poli-L-lisina. La paraffina è stata rimossa mediante passaggi in xilene, e successivamente, le sezioni state reidratate nella serie graduale di alcoli. Dopo lavaggio in PBS, le sezioni sono state trattate con H₂O₂ al 3% per 5 min, per inibire l'attività perossidasi endogena. Successivamente le sezioni sono state incubate con l'anticorpo policlonale anti-Nupr1/p8 per 1 ora a T ambiente. In seguito, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con la biotina e per 30 min con la streptavidina coniugata con la perossidasi. Infine le sezioni sono state contro colorate con l'ematossilina di Meyer e osservate al microscopio ottico.

Analisi statistica

Tutti i risultati ottenuti sono riportati come media \pm DS di almeno due esperimenti. La significatività p è stata calcolata mediante l'analisi del *t* di Student. Sono stati considerati significativi i risultati con valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

L'HCC, come già detto, mostra un'ampia eterogeneità e pertanto il trattamento farmacologico con sorafenib può avere un'efficacia diversa in base al sottogruppo di appartenenza del tumore. Una precisa conoscenza del meccanismo d'azione del farmaco è quindi di fondamentale importanza per massimizzare l'efficacia del trattamento, minimizzando gli eventuali effetti collaterali associati all'uso del farmaco.

Per questo motivo, in questo studio sono state utilizzate quattro linee cellulari umane di epatocarcinoma (HepG2, Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5) con caratteristiche genetiche differenti che, in parte riflettono l'eterogeneità e le diverse caratteristiche molecolari dei tumori primari (tabella 3).

Cell Line	Tumor Type	Origin	p53 pathway	Rb pathway	Wnt/ β -catenin pathway	AFP	HBV	Other Characteristics
HepG2	Human Caucasian hepatocarcinoma	Epithelial well-differentiated	Normal	Normal	β -catenin ($\Delta E3/wt$)	+	-	Mutation in N-Ras; EGFR negative
Huh7	Human hepatocarcinoma	Epithelial well-differentiated	p53 Mutation Y220C	Normal	Normal	+	-	p21-deficient; FANCD2 deleted; c-Met negative
Hep3B	Human Negroid hepatocarcinoma	Epithelial well-differentiated	p53 homozygotic deletion	pRb undetected	Normal	+	Integrated	Mutation in Fas; c-Met negative
PLC/PRF/5	Human liver hepatoma	Epithelial well-differentiated	p53 Mutation pR249S	Normal	Axin1 ($\Delta E4/-$)	N/A	Integrated	EGFR positive; Expresses c-abl, c-myc, c-ha-ras and c-sis oncogenes; p21-deficient
SNU475	Human Asian hepatocarcinoma	Poorly-differentiated	P53 Mutation (N239D/C275R/N288S)	P16 promoter hypermethylation	Axin1 homozygotic deletion	+/-	N/A	Expresses high levels of mesenchymal markers;

Tabella 3. La tabella mostra le differenti caratteristiche di differenziamento, comportamento biologico e difetti genetici delle linee cellulari indicate.

E' stato, quindi, preliminarmente analizzato l'effetto del trattamento farmacologico con sorafenib sulla vitalità cellulare. Successivamente, è stato studiato il meccanismo d'azione del sorafenib, con particolare attenzione alla sua capacità di indurre il pathway dello stress dell'ER.

Tra le proteine coinvolte nel pathway dello stress dell'ER, particolare importanza riveste la Nuclear Protein 1 (Nupr1/p8) che, in molti modelli tumorali, sembra essere coinvolta nella

regolazione della progressione tumorale e nella resistenza tumorale ai trattamenti farmacologici (55, 62, 64, 65).

Si è voluto, quindi, indagare sul possibile coinvolgimento di Nupr1/p8 nel processo di epatocarcinogenesi e sul ruolo di questa proteina nella regolazione della proliferazione delle cellule tumorali e nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib.

Effetti del sorafenib sulla vitalità cellulare in linee cellulari umane di HCC

Per analizzare l'effetto sulla vitalità cellulare sono stati condotti in quattro linee cellulari di HCC dei saggi MTS dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con dosi crescenti di sorafenib.

Come si può osservare dalla Figura 10, il trattamento farmacologico con sorafenib riduce significativamente la vitalità cellulare nelle quattro linee cellulari di HCC utilizzate in maniera dose- e tempo-dipendente.

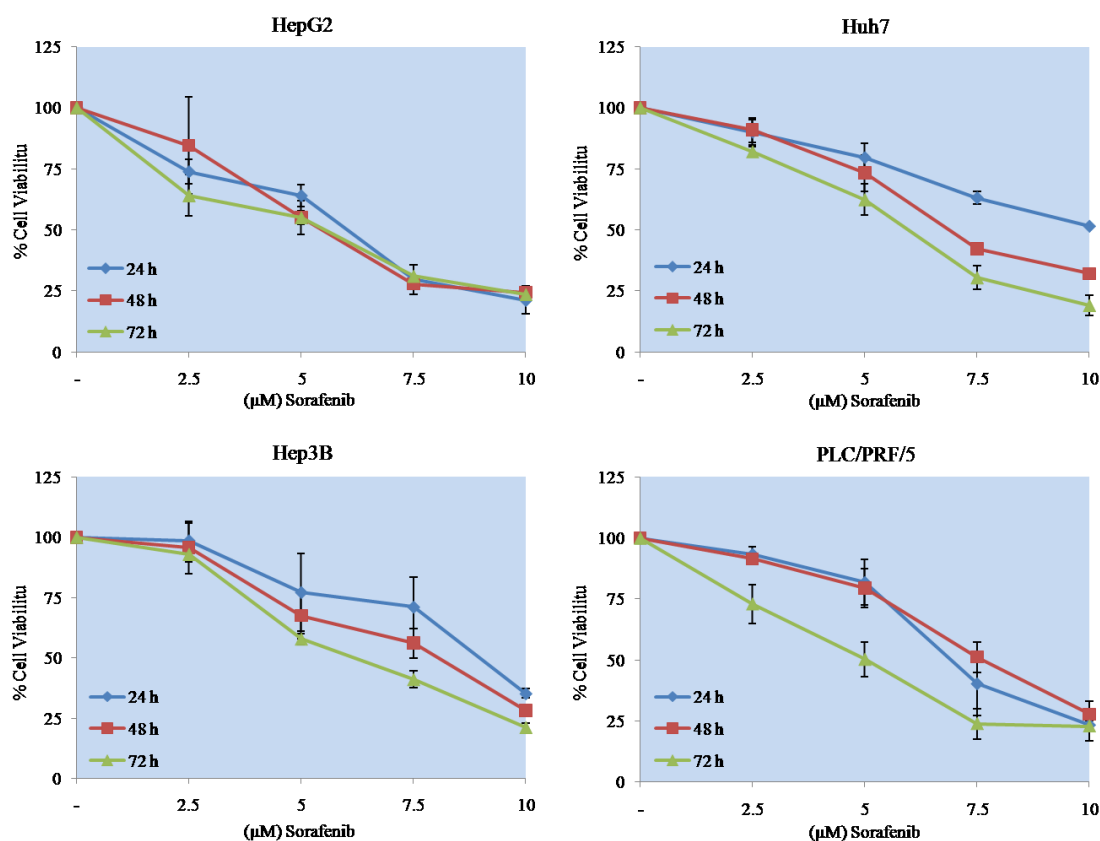


Figura 10. Effetti del trattamento farmacologico con sorafenib sulla vitalità cellulare nelle linee cellulari di HCC. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo (=100%) e sono la media di almeno due esperimenti \pm DS, ciascuno dei quali condotto in triplicato.

Effetti del trattamento farmacologico con sorafenib sul livello di espressione di geni coinvolti nel pathway dello stress dell'ER

Alla luce dei dati ottenuti, abbiamo voluto valutare il meccanismo molecolare responsabile degli effetti del sorafenib sulla vitalità cellulare osservati nelle quattro linee cellulari di HCC.

E' noto che il sorafenib sia in grado di ridurre la vitalità cellulare attraverso l'inibizione del pathway oncogenico di MEK/ERK ma poco si sa sul meccanismo molecolare d'azione MEK/ERK-indipendente di questo farmaco.

Nel modello leucemico, è stato osservato che il sorafenib è in grado di determinare morte cellulare attraverso l'induzione del pathway dello stress dell'ER (21, 23), pare, dunque, che lo stress dell'ER faccia parte del programma di morte MEK/ERK-indipendente indotto dal sorafenib. Per questo motivo, abbiamo voluto analizzare nelle linee cellulari di HCC se e come il trattamento farmacologico con sorafenib potesse influenzare il livello di espressione dei geni coinvolti nel pathway della risposta allo stress dell'ER, come ad esempio i geni *GRP78*, *XBPI*, *TRB3*, *ATF4*, e *CHOP*. L'analisi mediante RT-PCR semiquantitativa ha mostrato che il trattamento farmacologico con sorafenib induce l'espressione di questi geni coinvolti nel pathway dello stress dell'ER in maniera dose- e tempo-dipendente (figure 11 A e B). In particolare, si è osservato un incremento del livello del messaggero specifico per *TRB3*, *CHOP* e *ATF4* e lo splicing dell'mRNA codificante per *XBPI* che determina una modifica frameshift nella traduzione della proteina che sarà, quindi prodotta in forma attiva.

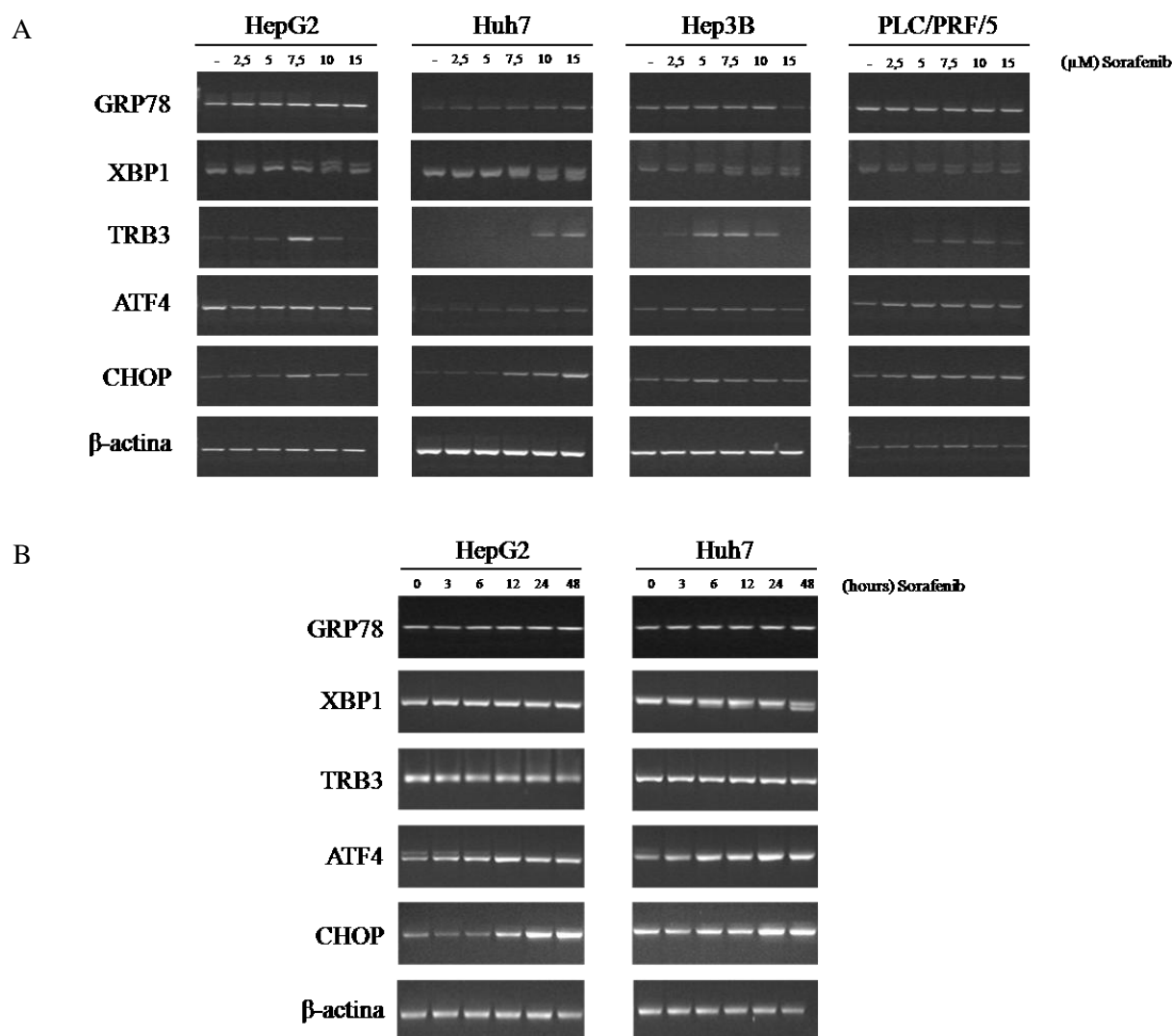


Figura 11. Analisi mediante RT-PCR semiquantitativa dei cambiamenti nei livelli di espressione degli mRNA specifici di alcuni geni coinvolti nel pathway dello stress dell'ER, in seguito a trattamento con sorafenib nelle quattro linee cellulari di HCC HepG2, Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5. (A) Le cellule sono state trattate per 24 ore con dosi crescenti di sorafenib e l'RNA totale è stato estratto con il metodo del TRIzol. (B) Le cellule (HepG2 e Huh7) sono state trattate con una dose fissa di sorafenib (7.5 μ M) per tempi differenti (0-3-6-12-24 ore); al termine di ogni trattamento l'RNA totale è stato estratto con il metodo del TRIzol.

Come detto precedentemente, tra i geni coinvolti nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico, particolare importanza sembra rivestire il gene codificante per la Nuclear Protein 1 (Nupr1/p8).

Abbiamo voluto quindi analizzare se e come il trattamento farmacologico con sorafenib potesse influenzare il livello di espressione del gene che codifica per Nupr1/p8 nelle linee cellulari di HCC. L'analisi mediante RT-PCR semiquantitativa ha mostrato che il trattamento farmacologico con sorafenib aumenta il livello di espressione dell'mRNA codificante per

Nupr1/p8 in maniera dose- e tempo-dipendente, in tutte le linee cellulari di HCC analizzate (figura 12), suggerendo un possibile coinvolgimento di Nupr1 nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib.

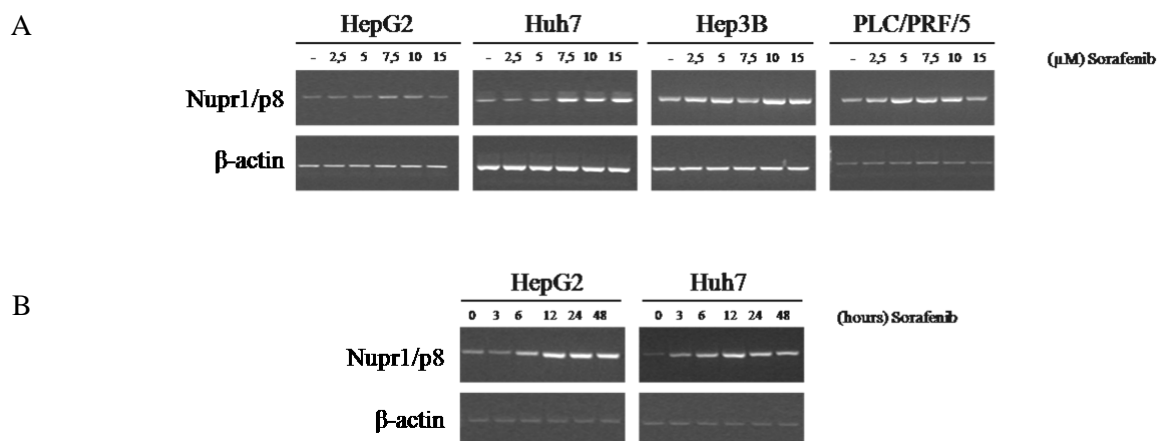


Figura 12. Analisi mediante RT-PCR semiquantitativa dei cambiamenti nel livello di espressione di Nupr1/p8 in seguito a trattamento con dosi crescenti di sorafenib (A) o al trattamento con 7.5 μM sorafenib per tempi differenti (B).

Effetti del trattamento con sorafenib sul livello di espressione della proteina Nupr1/p8.

Per valutare, se il trattamento farmacologico con sorafenib potesse determinare cambiamenti anche nel livello di espressione della proteina Nupr1/p8, nelle cellule di HCC, è stata condotta un'analisi di immunofluorescenza nelle cellule PLC/PRF/5 trattate con dosi crescenti di sorafenib (10-20-30 μM) per 3 e 6 ore. Come si può osservare in figura 13, il livello di espressione nucleare della Nupr1/p8 aumenta già dopo 3 ore di trattamento con sorafenib in maniera dose-dipendente. Risultati analoghi sono stati osservati anche dopo 6 ore di trattamento con sorafenib (dato non mostrato).

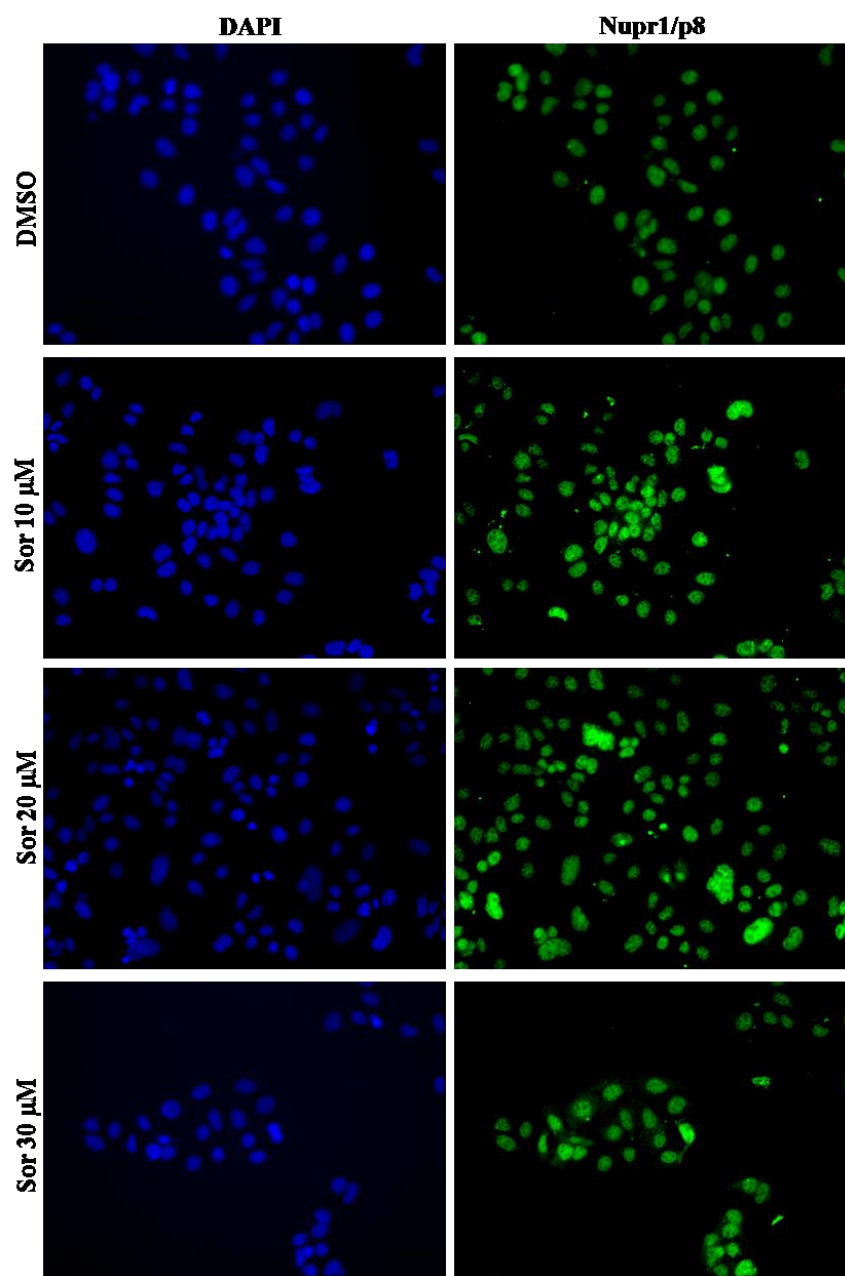


Figura 13. Analisi dei livelli di espressione della proteina Nupr1/p8 mediante immunofluorescenza nelle cellule PLC/PRF/5. Le cellule sono state trattate per 3 ore con le dosi indicate di sorafenib . I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu).

Studio dei livelli di espressione di Nupr1/p8 in tessuti di pazienti affetti da HCC

L'espressione della proteina Nupr1/p8 in tessuti tumorali di pazienti affetti da HCC e in tessuti epatici sani, ottenuti previo consenso informato da pazienti sottoposti ad interventi di colecistectomia, è stata studiata mediante analisi di immunoistochimica. I risultati ottenuti hanno mostrato un'iperespressione di Nupr1/p8 nei tessuti tumorali dei pazienti affetti da HCC rispetto ai tessuti epatici sani, che mostrano un ridottissimo livello di espressione della

proteina. La colorazione immunohistochemica ha mostrato una localizzazione quasi esclusivamente nucleare della Nupr1/p8 negli epatociti tumorali e un livello di espressione molto basso della proteina nei nuclei degli epatociti sani (figura 14).

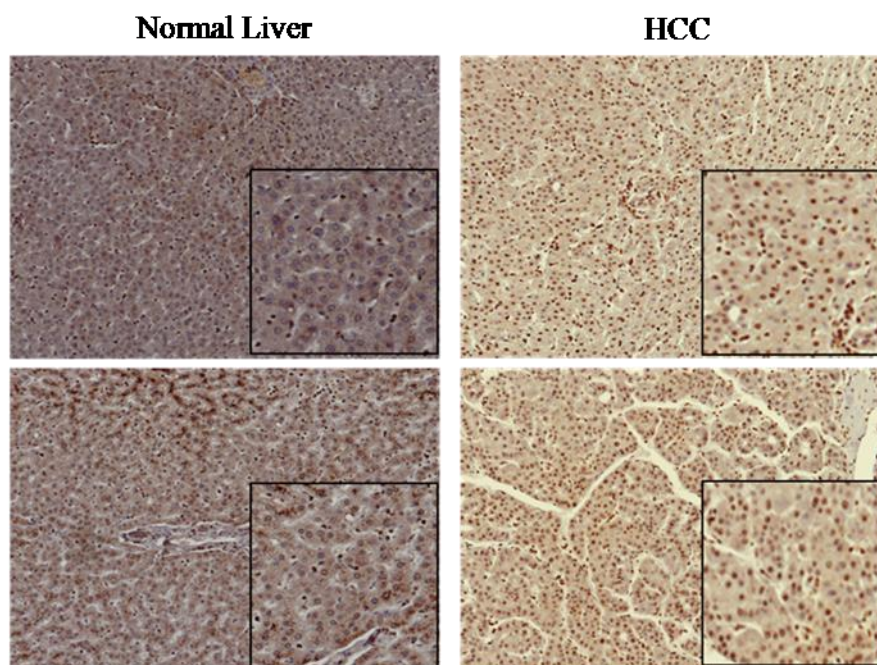


Figura 14. Analisi, mediante immunohistochemica, dei livelli di espressione di Nupr1/p8 in tessuti tumorali (HCC) ottenuti da pazienti affetti da HCC e in tessuti epatici sani (Normal Liver).

Inoltre, i livelli di espressione del messaggero specifico per Nupr1/p8 in 17 tessuti tumorali, in 5 tessuti cirrotici e in 5 tessuti epatici sani sono stati studiati mediante analisi quantitativa di Real-Time PCR (figura 15).

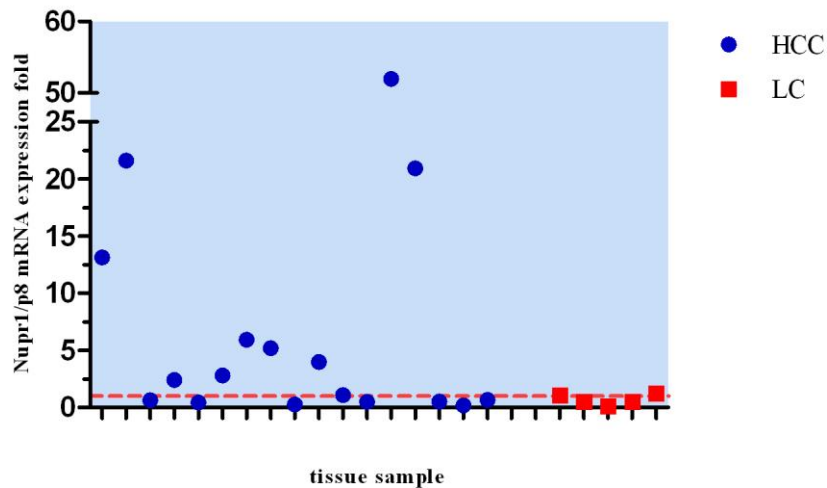


Figura 15. Livelli di espressione del messaggero specifico per Nupr/p8 in 17 campioni di tessuti tumorali di HCC e in 5 campioni di tessuti cirrotici (LC), ottenuti tramite qRT-PCR. I dati sono stati riportati come numero di volte di induzione del gene specifico rispetto al controllo (=1) rappresentato dalla media dei Ct di campioni di fegato sano. La linea tratteggiata indica il livello di espressione basale dei tessuti normali.

I dati, mostrati in figura 15, evidenziano come il livello di espressione del messaggero di Nupr1/p8 sia elevato in 9 pazienti su 17 analizzati (52.9%) rispetto ai tessuti epatici sani. Al contrario nei 5 campioni di fegato cirrotico non si evidenzia un aumento notevole del livello di espressione del messaggero specifico per Nupr1/p8.

Questi risultati evidenziano, quindi, un ruolo fondamentale di Nupr1/p8 nel processo di epatocarcinogenesi.

Studio del ruolo di Nupr1/p8 nelle linee cellulari Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5 mediante silenziamento genico

Nupr1/p8 è un gene dello stress la cui attività sembra essere necessaria per lo sviluppo e la progressione tumorale (68), e i nostri dati “ex vivo” ottenuti su tessuti di pazienti affetti da HCC lasciano ipotizzare questo ruolo di Nupr1/p8 anche nel caso dell’HCC.

Per analizzare il ruolo funzionale di Nupr1 nell’HCC sono stati quindi condotti diversi studi “in vitro” utilizzando tre linee cellulari umane di HCC (Huh7, Hep3B e PLC/PRF/5) che mostrano livelli differenti del messaggero specifico per Nupr1/p8, in condizioni basali (figura 16).

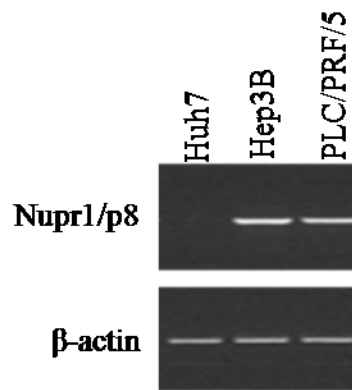


Figura 16. Analisi, mediante RT-PCR semiquantitativa, dei livelli di espressione basale di Nupr1/p8 in tre linee cellulari umane di HCC.

Innanzitutto, il ruolo di Nupr1/p8 nel controllo a breve termine della vitalità cellulare e nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib è stato analizzato mediante saggi MTS. A questo scopo le cellule di HCC sono state trasfettate in maniera transiente con un siRNA specifico per il gene *Nupr1/p8* e quindi successivamente le cellule trasfettate sono state trattate con sorafenib. In dettaglio, 24 ore dopo la trasfezione, cellule trasfettate con il siRNA specifico per il gene *Nupr1/p8* e cellule trasfettate con un siRNA negative control (NC) sono state piastrate ad una concentrazione di 5×10^3 per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Il giorno successivo, sono state aggiunte dosi crescenti di sorafenib e dopo 48 ore di trattamento è stato valutato l'effetto del farmaco sulla vitalità cellulare. Come mostrato in figura 17, già in condizioni basali, il silenziamento del gene *Nupr1/p8* riduce significativamente la vitalità cellulare e aumenta la sensibilità delle cellule al trattamento farmacologico con sorafenib.

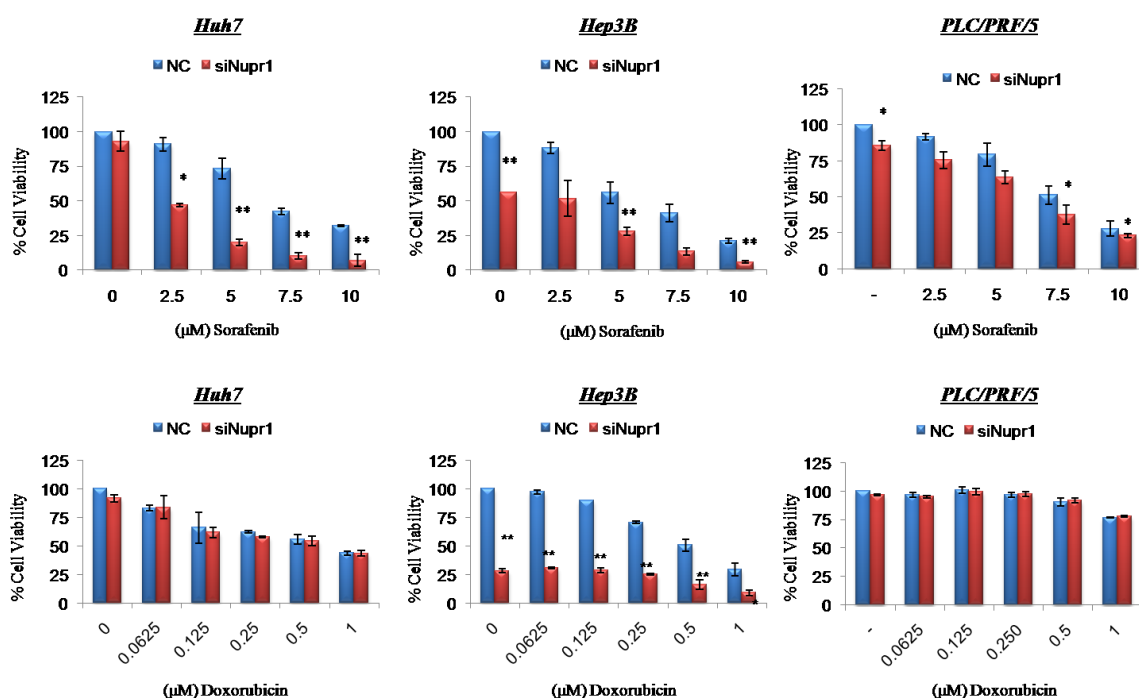


Figura 17. Analisi della vitalità cellulare dopo 48 ore di trattamento con dosi crescenti di sorafenib (A) e doxorubicina (B) in cellule silenziate per Nupr1/p8 rispetto alle cellule trasfettate con il siRNA NC. (* $p < 0.05$ rispetto al controllo non trattato; ** $p < 0.01$ rispetto al controllo non trattato; # $p < 0.05$ rispetto al controllo trattato).

Questi dati suggeriscono che nelle cellule PLC/PRF/5 e Hep3B che hanno alti livelli di espressione basale del messaggero specifico per Nupr1/p8, questo fattore svolge un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza cellulare e rappresenta un fattore di resistenza al trattamento farmacologico con sorafenib. D'altra parte, nelle cellule Huh7, che mostrano bassissimi livelli basali di messaggero, Nupr1/p8 non sembra influenzare affatto la vitalità delle cellule tumorali in assenza di trattamento (condizioni basali) ma svolge un ruolo chiave nella regolazione della sensibilità di questa cellule al trattamento farmacologico con sorafenib.

Inoltre, in queste linee cellulari, è stato valutato anche l'effetto del silenziamento genico di Nupr1/p8 nella risposta al trattamento con un chemioterapico convenzionale, come la doxorubicina. La figura 17B mostra come il silenziamento di Nupr1/p8 aumenta significativamente la sensibilità al trattamento farmacologico con la doxorubicina, solo nella linea cellulare Hep3B.

Successivamente, è stato analizzato il ruolo di Nupr1/p8 nella regolazione a lungo termine della proliferazione cellulare, valutando la capacità clonogenica delle diverse linee cellulari di HCC mediante saggi di colony assay. La figura 18 mostra i livelli di capacità clonogenica

delle cellule silenziate con il siRNA specifico per Nupr1/p8 rispetto alle cellule trasfettate con il siRNA Negative Control (NC).

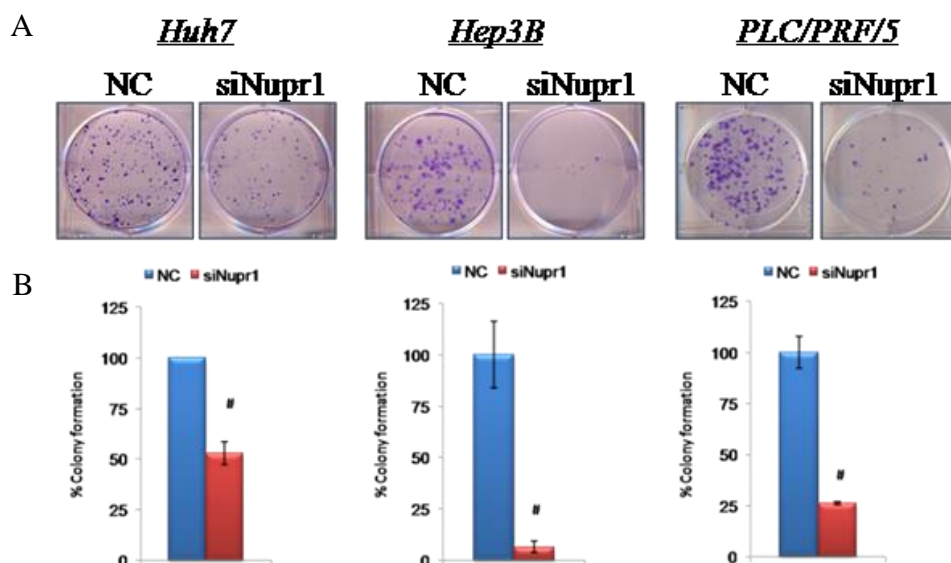


Figura 18. Studio della capacità clonogenica, mediante saggio clonogenico, in cellule silenziate per Nupr1/p8 rispetto a cellule trasfettate con il siRNA NC (A). I dati ottenuti sono stati riportati in percentuale rispetto al controllo rappresentato dalle cellule silenziate con il siRNA NC e rappresentano le medie delle percentuali \pm DS di due esperimenti, ciascuno dei quali condotto in doppio. (# $p < 0.05$ rispetto al controllo).

I dati relativi alla clonogenicità delle cellule silenziate per Nupr1/p8 sono stati riportati in percentuale rispetto al controllo (=100%), rappresentato dalle cellule trasfettate con il siRNA NC. Come mostrato nel grafico, il silenziamento di Nupr1/p8 riduce significativamente la capacità di formare colonie delle cellule silenziate, suggerendo, ancora una volta, un importante ruolo della proteina nella regolazione della proliferazione cellulare di tutte le linee cellulari.

A questo punto, si è voluto analizzare nelle tre linee cellulari di HCC il pattern di espressione genica dopo il silenziamento di Nupr1/p8 valutando, tramite analisi RT-PCR semiquantitativa, la presenza di eventuali cambiamenti nei livelli di espressione basali di alcuni geni che, dalla letteratura, risultano essere target di Nupr1/p8, come ad esempio i geni *RELB* che codifica per la proteina RelB, *Immediate Early Response 3 (IER3)* che codifica per la proteina IEX1 (63), e *Tribbles homolog 3 (TRB3)* (62).

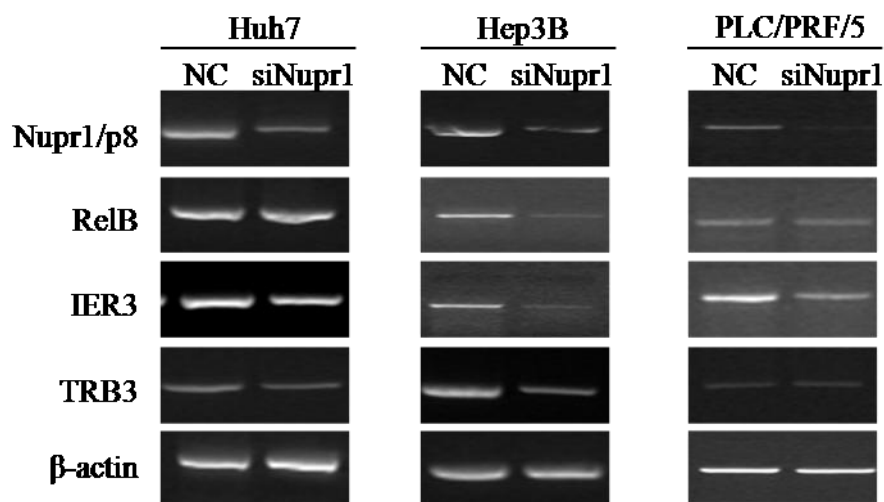


Figura 19. Analisi, mediante RT-PCR, dei livelli di espressione basale di alcuni geni target di Nupr1/p8 dopo silenziamento genico mediante l'utilizzo di un siRNA specifico per Nupr1/p8.

I dati ottenuti e riportati in figura 19 mostrano come, nelle tre differenti linee cellulari, il silenziamento di Nupr1/p8 influenzi diversamente i livelli di espressione di alcuni geni target di Nupr1/p8. In particolare, è stato osservato che nelle cellule Huh7, che mostrano livelli basali più bassi di messaggero specifico per Nupr1/p8, il silenziamento di questo gene sembra essere correlato esclusivamente ad una riduzione dei livelli di espressione del messaggero specifico per TRB3, coinvolto nell'attivazione del pathway dello stress del reticolo endoplasmatico. Nelle cellule Hep3B, che mostrano livelli basali più alti di espressione di Nupr1/p8, il silenziamento di questo gene è associato ad una significativa riduzione dei livelli di espressione del gene *TRB3* e di altri due geni, coinvolti in un pathway di sopravvivenza cellulare, noti come *RELB* e *IER3*. Infine, nelle cellule PLC/PRF/5 che mostrano livelli intermedi di messaggero specifico per Nupr1/p8, è stato osservato che la ridotta espressione di questo gene nelle cellule trasfettate con il siRNA specifico si correla esclusivamente con una riduzione dei livelli di espressione di RelB e IER3 ma non influenza i livelli di espressione di TRB3.

Studio del ruolo di Nupr1/p8 in cellule stabilmente silenziate con shRNA

Per valutare gli effetti a lungo termine del silenziamento di Nupr1/p8, cellule Hep3B sono state stabilmente trasfettate con un short hairpin RNA (shRNA) specifico per questo gene (indicato come sh9495). Cellule trasfettate con un vettore contenente una sequenza aspecifica

(pSilencer), che non influenza l'espressione di alcun gene, sono state utilizzate come controllo.

La vitalità cellulare delle cellule stabilmente trasfettate per Nupr1/p8 (sh9495) rispetto alle cellule controllo (pSilencer) è stata inizialmente valutata in tempo reale mediante l'uso del sistema Cell Analyzer xCELLigence (figura 20). In questo modo, è stato osservato che, già nelle prime 25 ore di crescita, il clone sh9495, stabilmente silenziato per Nupr1/p8, mostra una ridotta capacità di proliferazione cellulare rispetto al clone controllo pSilencer.

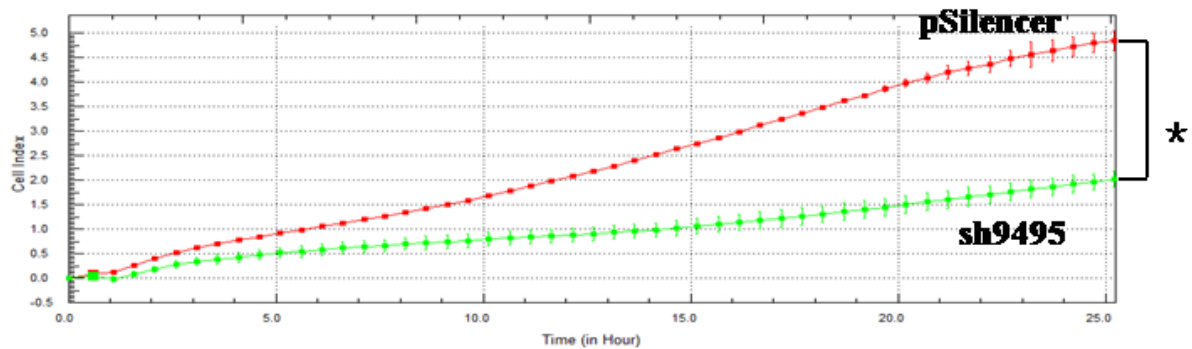


Figura 20. Studio della vitalità cellulare del clone Hep3B sh9495 stabilmente silenziato per Nupr1/p8 rispetto al clone controllo (pSilencer). (* $p < 0.05$).

Per valutare la capacità proliferativa del clone stabilmente silenziato per Nupr1/p8 (sh9495) e del clone controllo (pSilencer), e confermare i dati ottenuti a breve termine, sono state effettuate conte di vitalità cellulare effettuate, con l'utilizzo del Trypan Blue, a 1, 3 e 6 giorni di crescita. Le curve di crescita sono mostrate in figura 21A.

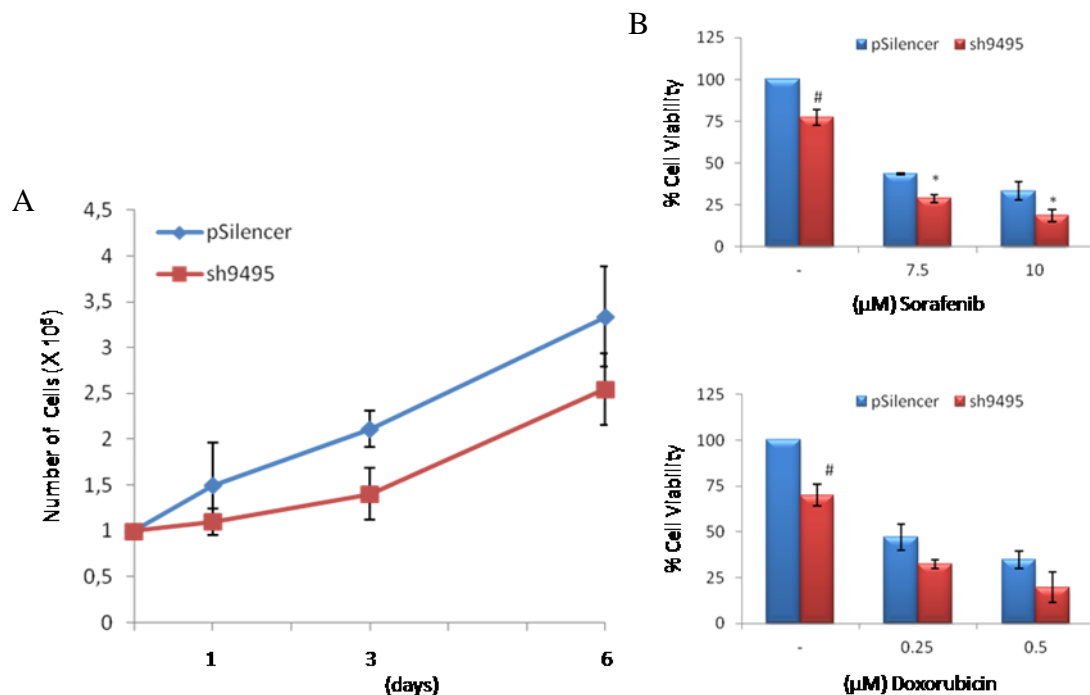


Figura 21. (A) Curve di crescita dei cloni Hep3B sh9495 e pSilencer costruite mediante conte di vitalità cellulare a 1, 3 e 6 giorni. (B) Effetti sulla vitalità cellulare del trattamento farmacologico con sorafenib e doxorubicina sui cloni stabili sh9495 e pSilencer. I dati sono stati riportati come percentuale delle conte di vitalità cellulare effettuate mediante l'utilizzo del Trypan Blue rispetto al controllo (100%) (# $p < 0.05$ rispetto al controllo non trattato; * $p < 0.05$ rispetto al controllo trattato).

Allo stesso modo, sono state effettuate delle conte di vitalità dopo trattamento per 48 h con differenti concentrazioni di sorafenib e doxorubicina. In figura 21B si può osservare che il clone Hep3B sh9495 stabilmente silenziato per Nupr1/p8 mostra un'elevata sensibilità sia al trattamento farmacologico con sorafenib che al trattamento con il chemioterapico convenzionale doxorubicina, confermando i dati già ottenuti negli esperimenti di trasfezione transiente con il siRNA specifico per Nupr1/p8.

Diversi evidenze suggeriscono che Nupr1/p8 svolge un ruolo importante nel processo di migrazione ed invasività delle cellule tumorali (55, 56, 69). Per analizzare il ruolo di Nupr1/p8 nel regolare la capacità di migrazione cellulare delle cellule di HCC, sono stati condotti saggi "transwell" utilizzando i due cloni stabilmente trasfettati. Cellule stabilmente silenziate per Nupr1/p8 e cellule controllo sono state piastrate in terreno completo senza siero fetale in camere di migrazione caratterizzate dalla presenza di pori da 8 μm. Nella parte inferiore della camera è stato aggiunto terreno completo al 20% di siero fetale per favorire la migrazione. Dopo 48 ore, le cellule migrate sono state fissate e colorate con crystal violetto. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 22.

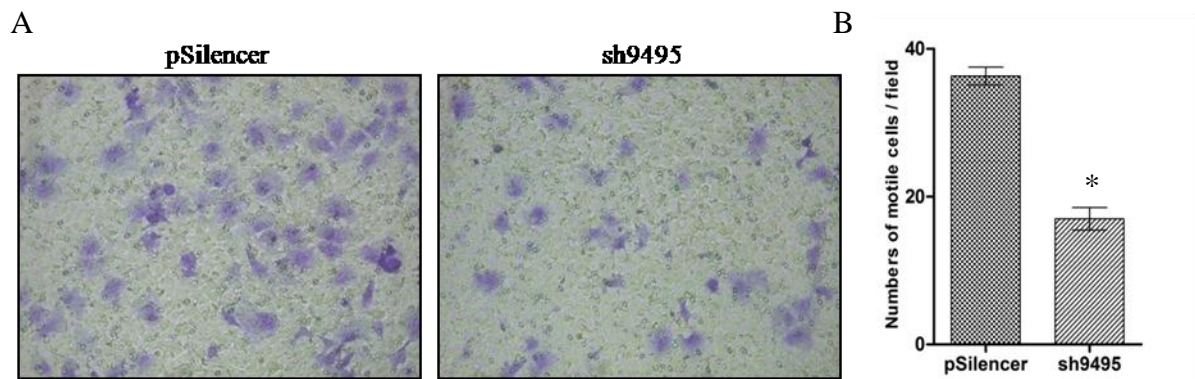


Figura 22. (A) Studio della migrazione cellulare mediante saggi Transwell condotti su cellule Hep3B stabilmente silenziate per Nupr1/p8 (sh9495) e cellule controllo indicate come pSilencer. In (B) i dati sono riportati come numero di cellule migrato per campo e rappresentano le medie \pm DS di due esperimenti, ciascuno dei quali condotto in doppio. (* $p < 0.05$ rispetto al controllo).

Come si può osservare, il clone Hep3B sh9495 mostra una notevole riduzione della capacità di migrazione cellulare, suggerendo un ruolo chiave di Nupr1/p8 nella regolazione di questo processo.

Allo stesso modo, sono stati condotti saggi di invasività cellulare per studiare la capacità invasiva del clone Hep3B stabilmente silenziato per Nupr1/p8 rispetto al clone controllo. In questo caso le cellule per migrare attraverso il setto poroso devono prima attraversare uno strato di proteine della matrice cellulare (strato di matrigel), capacità che hanno le cellule con caratteristiche invasive e metastatizzanti. I dati ottenuti (figura 23) hanno evidenziato che il clone Hep3B sh9495 mostra una riduzione significativa dell'invasività cellulare rispetto al controllo.

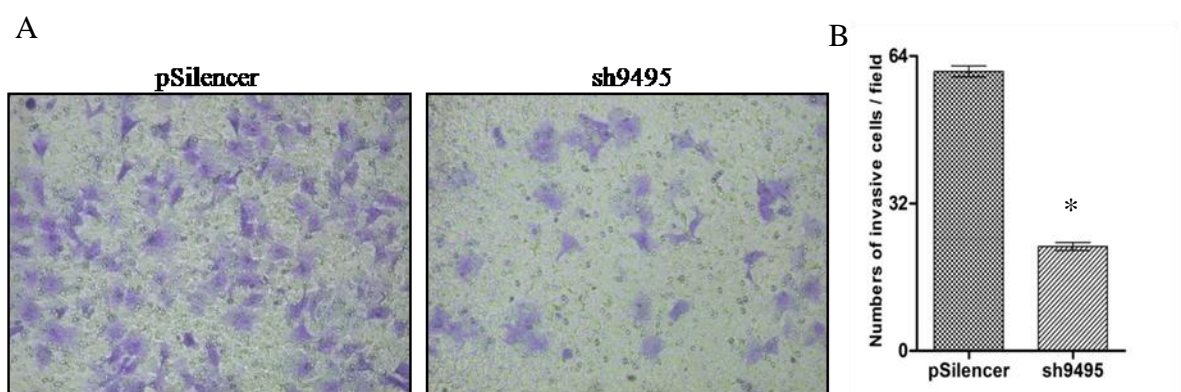


Figura 23. (A) Studio della capacità invasiva cellulare mediante saggi di invasività condotti su cellule Hep3B stabilmente silenziate per Nupr1/p8 (sh9495) e cellule controllo (indicate come pSilencer). In (B) i dati sono riportati come numero di cellule invasive per campo e rappresentano le medie \pm DS di due esperimenti, ciascuno dei quali condotto in doppio. (* $p < 0.05$ rispetto al controllo).

Infine, per confermare i dati ottenuti dopo trasfezione transiente, ho voluto valutare nei due cloni stabilmente trasfettati, mediante analisi quantitativa di Real-Time PCR, eventuali cambiamenti nei livelli basali di espressione di alcuni geni target di Nupr1/p8. I dati ottenuti e riportati in figura 24 mostrano che nel clone Hep3B sh9495, il silenziamento stabile di Nupr1/p8 correla con una ridotta espressione dei geni *TRB3*, *RELB* e *IER3*, coinvolti in un pathway di sopravvivenza cellulare.

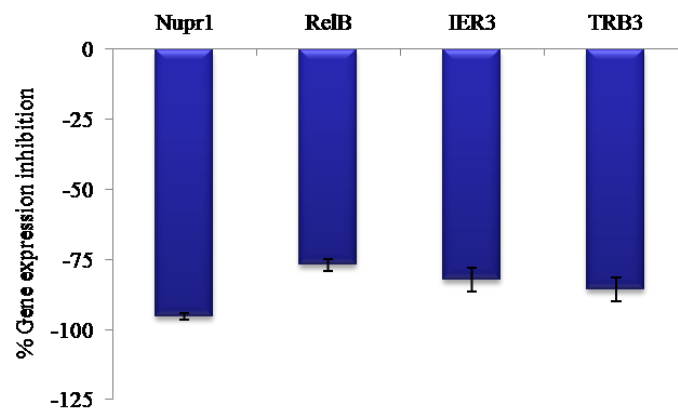


Figura 24. Analisi, mediante qRT-PCR, del pattern di espressione genica del clone sh9495 stabilmente silenziato per Nupr1/p8 rispetto al clone pSilencer, utilizzato come controllo.

In particolare, *IER3* è un gene target di NF- κ B implicato nella regolazione della vitalità cellulare. Diversi studi hanno mostrato che *IER3* sia in grado di amplificare il segnale di ERK1/2 fosforilato, attraverso l'inibizione della fosfatasi PP2A responsabile della defosforilazione di questo fattore in corrispondenza della treonina 202 (thr202) (70, 71).

Ho quindi condotto delle analisi mediante western blot dei livelli di fosforilazione delle proteine ERK1/2 nei due cloni stabilmente silenziati. I risultati ottenuti e riportati in figura 25 evidenziano che il clone Hep3B sh9495 mostra livelli ridotti di espressione di ERK1/2 fosforilato ma non di ERK1/2 totale, suggerendo l'esistenza di un link tra il pathway Nupr1/p8/RelB/IER3 e la regolazione dello stato di attivazione di questa chinasi.

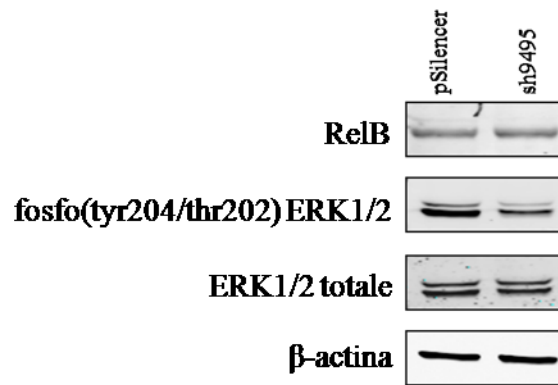


Figura 25. Analisi di espressione delle proteine RelB ed ERK1/2 mediante western blot nelle cellule Hep3B stabilmente trasfettate per Nupr1/p8 (sh9495) e nelle cellule controllo (pSilencer).

Studio della capacità tumorigenica di cellule stabilmente silenziate per Nupr1/p8

I dati ottenuti dagli esperimenti condotti sui cloni stabili hanno dimostrato, ancora una volta, che Nupr1/p8 svolge un ruolo fondamentale nel processo di proliferazione cellulare, nella chemioresistenza ai trattamenti farmacologici e nella regolazione della migrazione cellulare.

Alla luce di questi dati, ho voluto quindi valutare, mediante esperimenti “in vivo”, utilizzando un modello animale, se Nupr1/p8 potesse influenzare anche il grado di tumorigenicità di cellule tumorali di HCC. Cellule Hep3B sh9495 e cellule Hep3B pSilencer sono state inoculate in topi nudi, a livello sub-cutaneo, nei fianchi rispettivamente sinistro e destro di 8 animali. I risultati, ottenuti 4 settimane dopo l’inoculo, sono riportati in figura 26 e mostrano chiaramente come, a differenza del clone Hep3B pSilencer, il clone Hep3B sh9495 stabilmente silenziato per Nupr1/p8 non sia in grado di formare tumori in topi nudi.

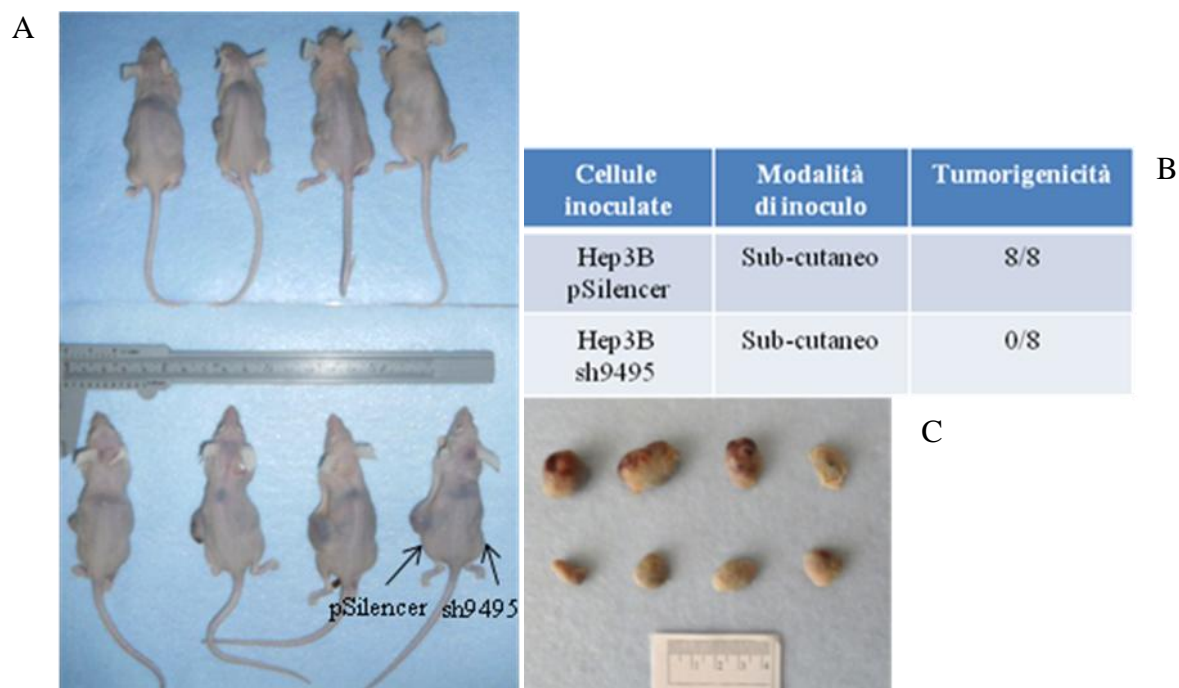


Figura 26. Risultati di esperimenti di xenograft effettuati su topi nudi del ceppo CJ57BL. Cellule del clone Hep3B sh9495 e cellule del clone controllo pSilencer sono state inoculate a livello sub-cutaneo in 8 animali (A) in corrispondenza del fianco destro e sinistro, rispettivamente. (B) Tumorigenicità dei cloni inoculati. (C) Dimensioni dei tumori (pSilencer) espuntati 4 settimane dopo l'inoculo.

Ciò ha dimostrato che Nupr1/p8 svolge un ruolo fondamentale nell'attecchimento e nello sviluppo del tumore, in quanto è in grado di definire la tumorigenicità delle cellule tumorali inoculate in topi nudi.

Studio del ruolo funzionale dei geni *RELB* e *IER3* in cellule Hep3B mediante silenziamento genico

RelB, che fa parte del pathway non canonico di NF- κ B, è una proteina coinvolta nella regolazione della sopravvivenza di diversi tipi cellulari, spesso di origine ematopoietica ma anche di origine epiteliale. Per esempio, l'espressione di RelB risulta necessaria per proteggere i timociti dall'apoptosi indotta dal differenziamento (72) e le cellule tumorali prostatiche dall'apoptosi indotta dalle radiazioni ionizzanti (73).

Studi condotti sul modello di tumore pancreatico hanno mostrato che, in condizioni di stress, l'iperespressione di RelB, indotta da Nupr1/p8, è sufficiente per attivare una risposta anti-apoptotica dipendente dal fattore IER3 (63).

Per valutare se, anche nell'HCC, gli effetti osservati dopo il silenziamento di *Nupr1* siano dipendenti dalla regolazione dei geni *RELB* e *IER3*, è stato studiato il ruolo di questi due geni tramite esperimenti di silenziamento genico.

Gli studi “in vitro” sono stati condotti sulla linea cellulare Hep3B che, tra le linee finora utilizzate, rappresenta quella che mostra i livelli basali più alti di messaggero specifico per *Nupr1/p8*.

Per valutare il grado di silenziamento di *RelB* e *IER3*, l'RNA è stato estratto 48 ore dopo la trasfezione e, dopo la retro-trascrizione dell'RNA in cDNA, è stato valutato, mediante real-time PCR, il livello di espressione degli mRNA codificanti per *RelB*, *IER3* e *Nupr1/p8* nelle cellule trasfettate rispetto alle cellule controllo. Come mostrato in figura 27, il silenziamento di *RelB* e *IER3* determina una down-regolazione del livello di espressione di *Nupr1/p8*, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di regolazione trascrizionale a feedback. Alcuni studi, infatti, hanno riportato l'esistenza di elementi di risposta a NF- κ B (NRE) nel promotore del gene *Nupr1/p8* e la loro funzionalità è stata ampiamente documentata (74, 75).

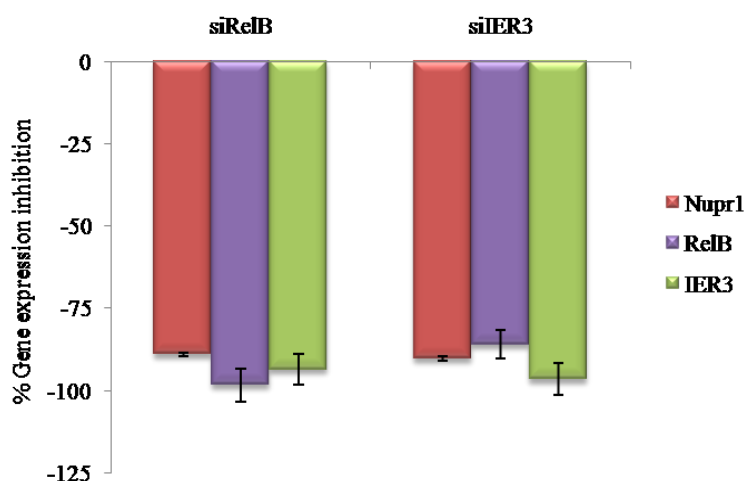


Figura 27. Studio dell'espressione genica, mediante qPCR, in cellule Hep3B trasfettate con i siRNA specifici per *RelB* e *IER3* rispetto alle cellule controllo trasfettate con il siRNA negative control (NC). I dati sono stati riportati come % di inibizione dell'espressione genica rispetto al controllo (=0).

Per valutare gli effetti a breve termine di *RelB* e *IER3* sulla vitalità cellulare e sulla risposta al trattamento farmacologico con sorafenib sono stati condotti saggi MTS.

Cellule trasfettate con i siRNA specifici per *RelB* e *IER3* e cellule controllo trasfettate con il siRNA Negative Control (NC) sono state trattate con dosi crescenti di sorafenib e, dopo 48 ore di trattamento, è stato valutato l'effetto del silenziamento di ciascun gene sulla vitalità

cellulare e sulla risposta al trattamento farmacologico. Come mostrato in figura 28, il silenziamento dei geni *RelB* e *IER3* riduce significativamente la vitalità cellulare, già in condizioni basali, e aumenta la sensibilità cellulare al trattamento farmacologico con sorafenib.

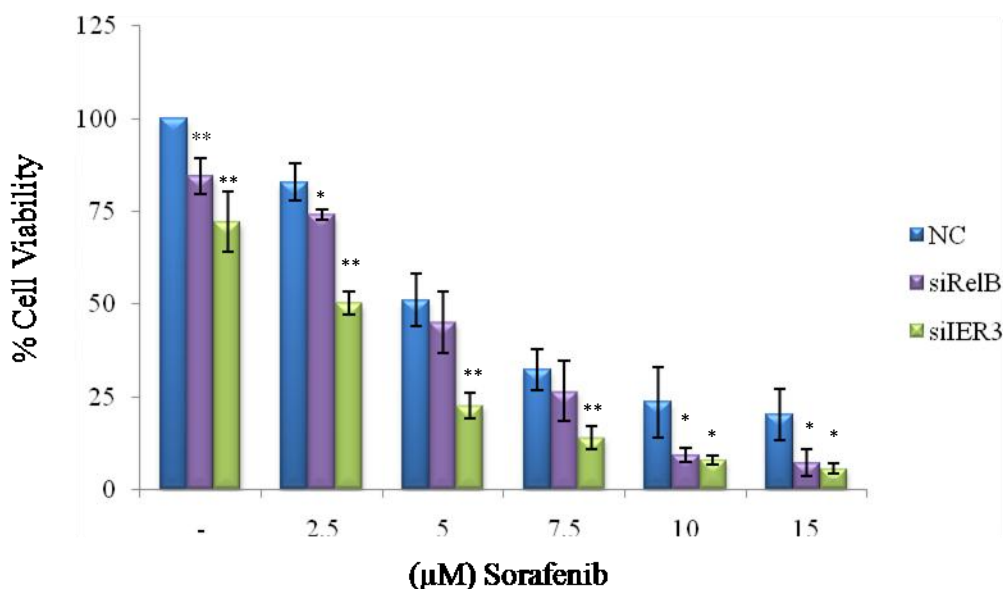


Figura 28. Analisi della vitalità cellulare in cellule silenziate per RelB e IER3 rispetto alle cellule trasfettate con il siRNA NC, dopo 48 ore trattamento con dosi crescenti di sorafenib (* $p < 0.05$ rispetto al controllo non trattato; ** $p < 0.01$ rispetto al controllo non trattato).

Questi dati dimostrano che anche le proteine RelB e IER3 svolgono un ruolo chiave nella regolazione della sopravvivenza cellulare e sono coinvolti nella resistenza al trattamento farmacologico con sorafenib, suggerendo che, come accade nel modello di tumore pancreatico, Nupr1/p8 agisca attraverso il pathway di RelB/IER3 per mediare i suoi effetti pro-tumorali in cellule di HCC.

Successivamente, è stato analizzato il ruolo di RelB e IER3 nella regolazione a lungo termine della proliferazione cellulare, valutando la capacità clonogenica delle cellule Hep3B attraverso saggi di colony assay. La figura 29 mostra i livelli di capacità clonogenica delle cellule silenziate con i siRNA specifici per RelB e IER3 rispetto alle cellule trasfettate con il siRNA Negative Control.

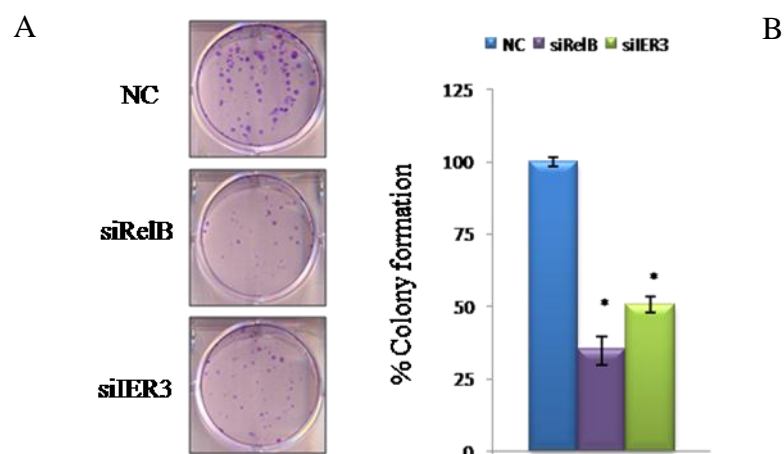


Figura 29. Studio della capacità clonogenica, mediante saggio clonogenico, in cellule silenziate per RelB e IER3 rispetto a cellule trasfettate con il siRNA NC (A). I dati ottenuti sono stati riportati in percentuale rispetto al controllo rappresentato dalle cellule silenziate con il siRNA NC e rappresentano le medie \pm DS di due esperimenti, ciascuno dei quali condotto in doppio. ($\#p < 0.05$ rispetto al controllo).

Come mostrato nel grafico, il silenziamento di RelB e IER3 riduce significativamente la capacità di formare colonie delle cellule silenziate, suggerendo, ancora una volta, un importante ruolo di queste proteine nella regolazione della proliferazione cellulare.

Studio dell'espressione genica globale in cellule Hep3B stabilmente silenziate per Nupr1/p8

Per comprendere meglio i meccanismi di azione di Nupr1/p8 nell'HCC, sono stati studiati i cambiamenti dell'espressione genica globale nel clone Hep3B sh9495 rispetto al controllo trasfettato con un vettore contenente una sequenza aspecifica (pSilencer). L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata tramite DNA microarray, utilizzando l'Agilent Whole Genome microarrays, contenente circa 44000 geni umani, e considerando come geni differentemente espressi nel clone sh9495 quelli che presentano una differenza di espressione di 1.5 volte rispetto al controllo pSilencer.

Utilizzando questi criteri di selezione, sono stati identificati nel clone sh9495 rispetto al controllo pSilencer 277 geni down-regolati e 69 geni up-regolati.

L'analisi dei pathway e dei network in cui questi geni risultano coinvolti, effettuata tramite il software IPA (Ingenuity Pathway Analysis), ha mostrato che i geni differentemente espressi nel clone Nupr1^{-/-} sono implicati principalmente nella regolazione del metabolismo lipidico,

nella morte e nella sopravvivenza cellulare, nella migrazione cellulare e nella regolazione del signalling cellula-cellula (figura 30).

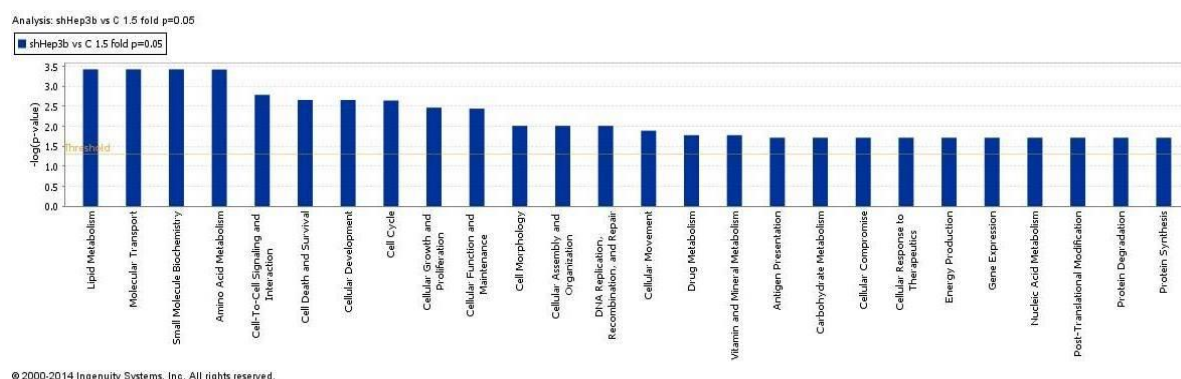


Figura 30. Analisi funzionale per dataset di geni differentemente espressi dopo il silenziamento stabile di Nupr1 nel clone Hep3B sh9495

Per validare i dati dei microarray, abbiamo arbitrariamente selezionato 5 geni, 3 down-regolati (*Runx2*, *Cry-2* e *TP63*) e 2 up-regolati (*KLF4* e *ATF6*), e quantificato il loro livello di espressione tramite qPCR rispetto al clone controllo pSilencer (Tabella 4).

Gene	Hep3B sh9495	
	DNA Microarray	qPCR
RUNX2	-1.736	-19.3487
CRY2	-1.673	-2.78962
TP63	-1.522	-1.11912
KLF4	1.578	-2.04069
ATF6	1.816	-2.28013

Tabella 4. Validazione dei dati ottenuti dai microarray tramite qPCR.

Per i geni *Runx-2*, *Cry-2* e *TP63* i risultati ottenuti mediante analisi di qPCR confermano i dati di analisi mediante microarray, evidenziando una significativa inibizione della loro espressione nel clone sh9495 rispetto al controllo, mentre per i geni *KLF4* e *ATF6* i dati ottenuti dai microarray non sono stati confermati con l'analisi di qPCR. E' comunque interessante notare che i dati ottenuti dalla qPCR sono in linea con il ruolo funzionale di questi due geni.

Nonostante numerosi studi abbiano dimostrato che KLF4 è un soppressore tumorale nei tumori di origine epiteliale e che la riduzione o la totale perdita di espressione della proteina KLF4 rappresenta un fattore di prognosi negativo per l'HCC (76, 77), altrettante numerose evidenze hanno suggerito che il ruolo di questo gene nella regolazione della soppressione tumorale risulta ancora abbastanza controverso. Studi condotti sul modello di tumore pancreatico hanno dimostrato, infatti, che KLF4 esiste in differenti isoforme e che l'iperespressione di alcune di queste risulta essere associata alla progressione tumorale e ad una riduzione del tempo di sopravvivenza dei pazienti (78). D'altra parte, ATF6 è gene coinvolto nel pathway dello stress del reticolo endoplasmatico la cui iperespressione sembra essere implicata nel processo di epatocarcinogenesi e anche nella patogenesi della steatoepatite non alcolica (24, 79). Non sorprende, dunque, che la riduzione dei livelli di espressione di entrambi questi geni, determinati tramite qPCR, caratterizzi il clone Hep3B sh9495 stabilmente silenziato per Nupr1/p8.

Studio del ruolo di Nupr1 nella regolazione del metabolismo lipidico

I dati dei microarray hanno, sorprendentemente, mostrato che alcuni geni differenzialmente espressi nel clone sh9495 rispetto al controllo risultano principalmente coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico. Per approfondire meglio questo aspetto, sono stati condotti degli studi "ex vivo" allo scopo di valutare il livello di espressione di Nupr1/p8 su campioni tissutali epatici di pazienti affetti da steatosi epatica non alcolica (Non Alcoholic Steatohepatitis, NASH) e su tessuti epatici sani. Come mostrato in figura 31, l'analisi di immunoistochimica ha rivelato che il livello di espressione della proteina è molto più elevato nei campioni tissutali con NASH rispetto ai tessuti epatici sani, e che la sua localizzazione è prevalentemente nucleare.

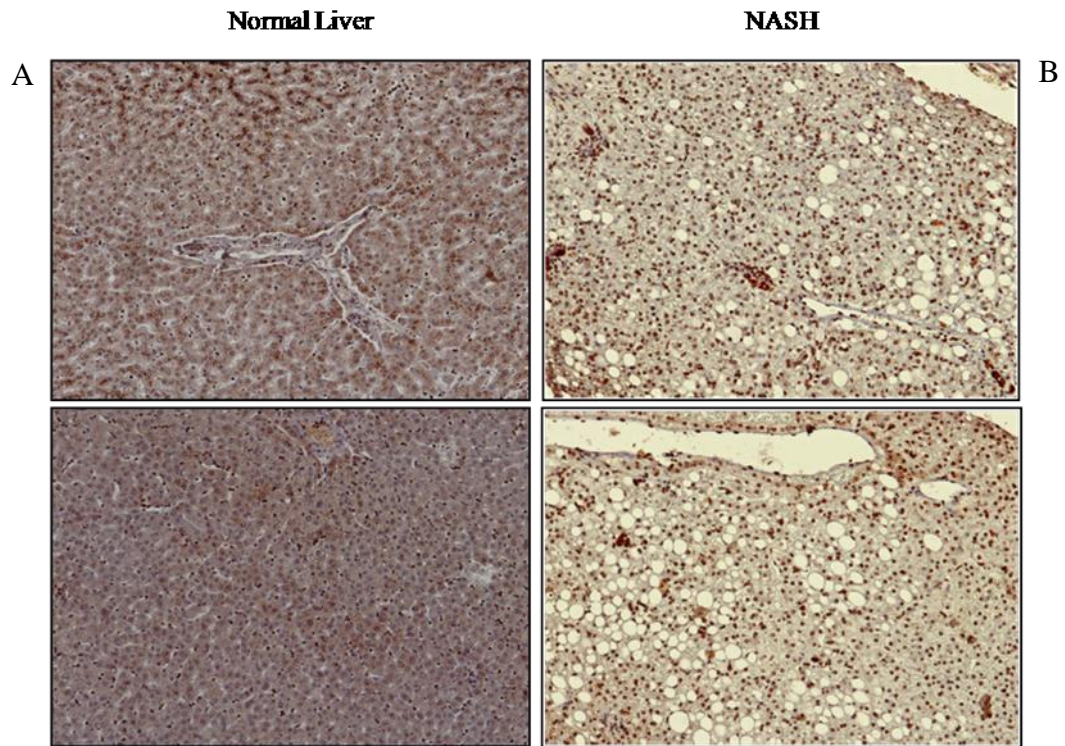


Figura 31. Analisi, mediante immunoistochimica, dei livelli di espressione di Nupr1 in tessuti epatici di pazienti affetti da NASH (B) e in tessuti epatici sani (A, Normal Liver).

Per confermare “in vitro” il possibile coinvolgimento di Nupr1/p8 nel processo di steatogenesi si è utilizzato come modello di studio quello in cui l’accumulo di lipidi nelle cellule epatiche è stimolato dalla somministrazione di acido oleico. Cellule Hep3B sh9495 e cellule controllo pSilencer sono state quindi trattate con dosi crescenti di acido oleico coniugato con BSA. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state fissate e colorate con Oil Red O, un colorante specifico per i trigliceridi neutri. I dati ottenuti e mostrati in figura 32 hanno evidenziato che il silenziamento di Nupr1/p8 riduce l’accumulo di lipidi intracellulare alle diverse dosi di acido oleico, suggerendo un importante ruolo della proteina nel processo di steatogenesi.

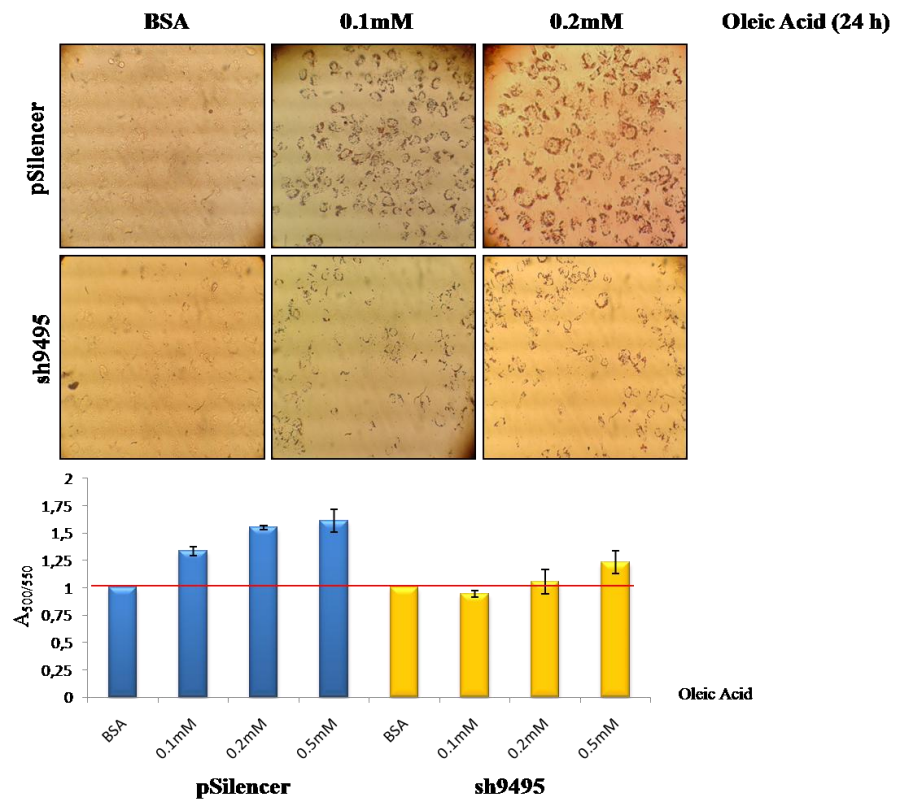


Figura 32. Colorazione con Oil Red O dei cloni Hep3B sh9495 e pSilencer. Cellule Hep3B sh9495 e cellule controllo (pSilencer) sono state trattate con dosi crescenti di acido oleico e, dopo 24 ore, colorate con una soluzione contenente Oil Red O. I dati sono stati riportati come rapporto dell'assorbanza letta a 550 nm (relativa al colorante Oil Red O eluito) e a 500 nm (relativa alla colorazione con crystal violetto) per ciascuna dose di acido oleico rispetto al controllo (=1) rappresentato dalle cellule trattate solo con BSA.

Inoltre, cellule HepG2 sono state trattate con dosi crescenti di acido palmitico coniugato con BSA e successivamente l'accumulo di lipidi è stato valutato tramite la colorazione con Bodipy (boro-dipirrometene), un colorante fluorescente. I dati, ottenuti dopo 48 ore di trattamento hanno mostrato che il trattamento con acido palmitico induce l'accumulo di goccioline lipidiche all'interno delle cellule (figura 33).

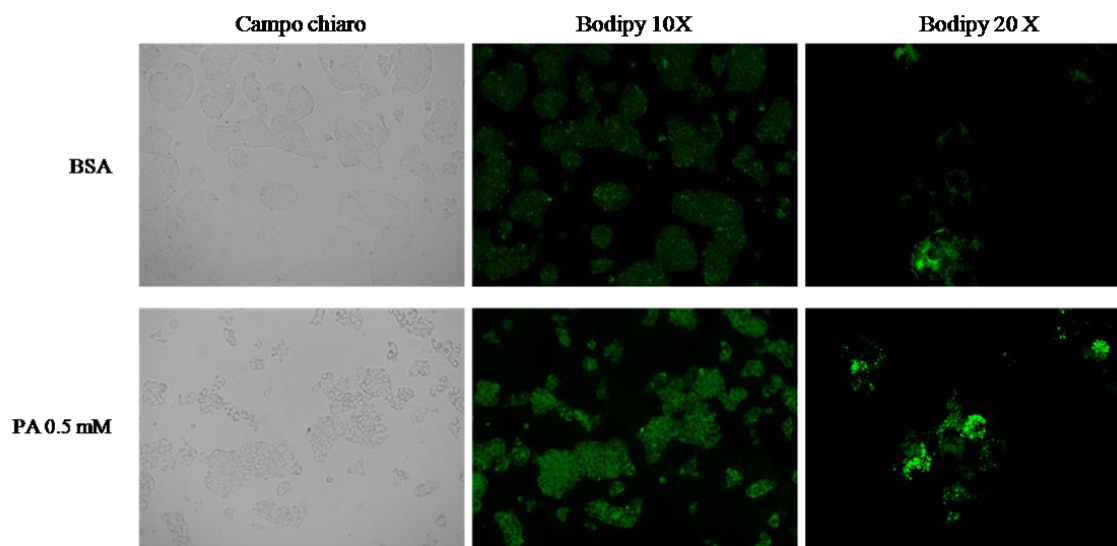


Figura 33. Colorazione con Bodipy. Cellule HepG2 sono state trattate per 24 ore con 0.5 mM di acido palmitico coniugato con BSA in RPMI al 5% di siero bovino fetale e successivamente sono state colorate con bodipy. Cellule trattate con BSA sono state utilizzate come controllo.

Le successive analisi di espressione genica dopo trattamento con acido palmitico, condotte tramite Real-Time PCR, hanno mostrato che l'acido palmitico induce nelle cellule HepG2 l'espressione di Nupr1/p8 e di altri geni coinvolti nel pathway dell'ER stress, come *CHOP* e *TRB3*, già dopo 6 ore di trattamento (figura 24). A 18 ore, si osserva un ulteriore aumento del livello di espressione degli mRNA codificanti per Nupr1, CHOP e TRB3 e una riduzione del livello di espressione di CHOP. Questi dati suggeriscono ancora una volta il coinvolgimento della proteina Nupr1/p8 e più in generale della risposta allo stress dell'ER nel processo di steatogenesi.

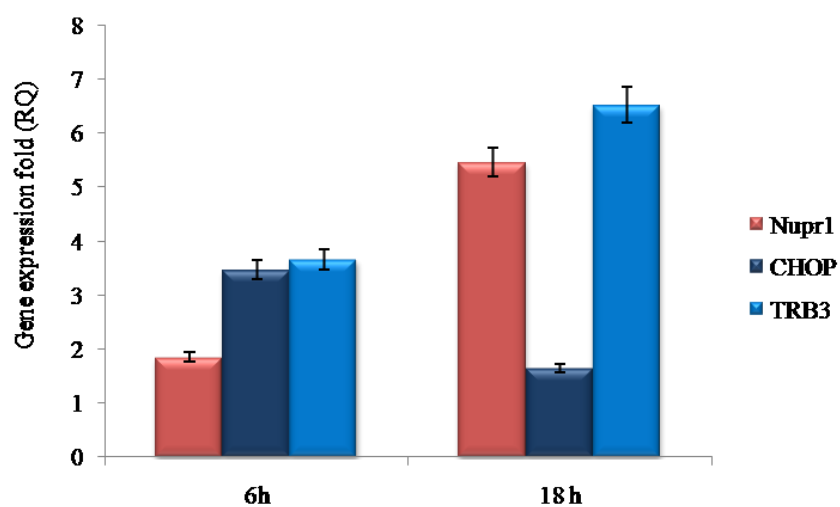


Figura 34. Studio dell'espressione degli mRNA codificanti per Nupr1, CHOP e TRB3, mediante qPCR, in cellule HepG2 trattate con 0.5 mM di acido palmitico coniugato con BSA per 6 e 18 ore. Cellule HepG2 trattate con BSA sono state utilizzate come controllo. I dati sono riportati come numero di volte di induzione dell'espressione genica nelle cellule trattate rispetto al controllo (=1).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questi tre anni di ricerca sono stati indagati i meccanismi molecolari di risposta al sorafenib allo scopo di identificare nuovi bersagli molecolari che possano essere utili per il trattamento del carcinoma epatocellulare. Come già detto, a causa della sua grande eterogeneità, l'HCC è una patologia molto difficile da trattare e il sorafenib rappresenta l'unico trattamento sistemico disponibile per il trattamento dei pazienti affetti da HCC in stadio avanzato (19). Nonostante ciò il meccanismo molecolare d'azione di questo farmaco non è stato ancora completamente chiarito. Diversi studi hanno dimostrato che questo farmaco è in grado di bloccare la proliferazione e di indurre morte cellulare attraverso meccanismi MEK/ERK-dipendenti e -indipendenti (20-22). In particolare, studi condotti inizialmente sul modello leucemico, hanno dimostrato che lo stress del reticolo endoplasmatico fa parte del programma di morte cellulare MEK/ERK-indipendente indotto dal sorafenib (23). Uno studio successivo, condotto sul carcinoma epatocellulare, ha dimostrato che anche in questo modello tumorale il trattamento farmacologico con sorafenib è in grado di indurre l'espressione di alcuni geni coinvolti nello stress del reticolo endoplasmatico e che questo incremento è ancora più evidente in seguito al trattamento con la combinazione sorafenib/celecoxib (26, 27).

E' noto che la condizione di stress del reticolo endoplasmatico determina l'attivazione di una risposta cellulare citoprotettiva nota come *unfolded protein response* (UPR) nel tentativo di ristabilire la normale omeostasi cellulare. Tuttavia stimoli di stress di lunga durata e la prolungata attivazione dell'UPR possono determinare gravi danni alla cellula che, dunque, andrà incontro ad apoptosi.

In questo studio, condotto su quattro linee cellulari umane di epatocarcinoma sono stati inizialmente valutati gli effetti sulla vitalità cellulare del trattamento farmacologico con sorafenib. I dati ottenuti dai saggi MTS hanno mostrato un effetto di riduzione tempo- e dose-dipendente della vitalità cellulare del sorafenib su tutte e quattro le linee cellulari utilizzate. Quindi, è stato indagato il meccanismo molecolare d'azione del sorafenib con particolare riguardo alla sua capacità di indurre lo stress del reticolo endoplasmatico. Confermando dati già noti in letteratura, sia su altri modelli tumorali che sullo stesso carcinoma epatocellulare, è stato osservato che il trattamento farmacologico con sorafenib è in grado di indurre l'espressione di diversi geni coinvolti nel pathway dello stress dell'ER come *Nupr1/p8*, *ATF4*, *CHOP* e *TRB3* e lo splicing dell'mRNA *XBPI* in maniera tempo- e dose-dipendente.

Tra i geni coinvolti nella risposta allo stress particolarmente interessante è il gene codificante per la proteina nuclear protein 1 (Nupr1) (nota anche come p8) che risulta iperespressa in diversi tipi di tumori umani e, in particolare, nelle forme avanzate e metastatiche di tumore pancreatico (50-56). Diversi studi hanno riportato che Nupr1/p8 possa agire sia da induttore che da soppressore della crescita tumorale e che risulta anche implicata nel meccanismo di chemioresistenza nei modelli di tumore pancreatico e mammario (64, 65). In particolare, nel modello pancreatico, è stato osservato che alcuni tipi di stress determinano un aumento dell'espressione di Nupr1/p8 e di tre dei suoi geni target *ATF4*, *CHOP* e *TRB3* che agiscono nel pathway dello stress dell'ER e che inducono morte cellulare (62). D'altra parte, studi successivi condotti su questo stesso modello tumorale hanno evidenziato che Nupr1/p8 sia in grado di indurre l'espressione di geni pro-sopravvivenza, come *RelB* e *IER3* che proteggono le cellule tumorali dalla morte stress-dipendente, conferendo resistenza al trattamento farmacologico con gemcitabina (63). Per questo motivo, Nupr1/p8 rappresenta un promettente target terapeutico e un fattore predittivo del potenziale metastatico di questa forma tumorale. Alla luce di queste conoscenze, nella seconda parte di questo studio, abbiamo voluto indagare il ruolo, finora mai analizzato, di Nupr1/p8 nell'HCC, valutando un suo possibile coinvolgimento nel processo di epatocarcinogenesi e nella risposta al trattamento farmacologico con sorafenib e con chemioterapici convenzionali, come la doxorubicina.

Confermando dati già ottenuti in altri modelli tumorali, gli studi "ex vivo" condotti mediante analisi di immunoistochimica hanno mostrato che, anche nell'HCC, Nupr1/p8 risulta iperespressa nei nuclei degli epatociti tumorali rispetto al tessuto epatico sano, dove si hanno ridottissimi livelli di espressione della proteina. D'altra parte, anche il messaggero specifico per Nupr1/p8 risulta aumentato in più 50% dei tumori analizzati, ma non nei tessuti cirrotici e nei tessuti epatici sani, suggerendo un suo ruolo nel processo di epatocarcinogenesi. Alla luce di questi dati, si è voluto approfondire, tramite esperimenti di silenziamento genico, il ruolo funzionale di Nupr1/p8 nell'HCC valutando il suo possibile coinvolgimento nella regolazione della sopravvivenza, della motilità cellulare e della risposta al trattamento farmacologico con sorafenib e doxorubicina.

Il silenziamento genico condotto su tre diverse linee cellulari che mostrano livelli basali differenti del messaggero per Nupr1/p8, tramite l'utilizzo di un siRNA specifico, ha dimostrato che Nupr1/p8 favorisce la sopravvivenza e la migrazione delle cellule tumorali e

rappresenta un fattore di resistenza al trattamento farmacologico con sorafenib e con doxorubicina.

Inoltre, esperimenti di xenograft condotti su topi nudi mediante l'inoculo di cellule stabilmente silenziate per Nupr1/p8, hanno mostrato che questo fattore ha un ruolo chiave anche "in vivo" nella regolazione della tumorigenicità delle cellule tumorali di HCC. Cellule di HCC stabilmente silenziate per Nupr1/p8 non sono in grado di formare tumori xenotrapiantati in topi nudi: ciò ha dimostrato che Nupr1/p8 svolge un ruolo fondamentale per l'attecchimento e la progressione del tumore epatico. Studi di espressione genica condotti tramite RT-PCR semi-quantitativa hanno evidenziato che il silenziamento genico di Nupr1/p8 determina una forte riduzione dei livelli di espressione dei messaggeri specifici per TRB3, coinvolto nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico e per RelB e IER3, coinvolti in un pathway di sopravvivenza cellulare.

In particolare, RelB, che fa parte del pathway non canonico di NF- κ B, è un gene coinvolto nella regolazione della sopravvivenza di diversi tipi cellulari, spesso di origine ematopoietica ma anche di origine epiteliale. Per esempio, l'espressione di RelB risulta necessaria per proteggere i timociti dall'apoptosi indotta dal differenziamento (73) e cellule tumorali prostatiche dall'apoptosi indotta dalle radiazioni ionizzanti. IER3 è un gene target di NF- κ B implicato nella regolazione della vitalità cellulare. Diversi studi hanno mostrato che IER3 sia in grado di agire da oncogene o oncosoppressore a seconda dello stimolo di stress che ne induce l'espressione. D'altra parte, numerose evidenze hanno suggerito che la sua attività anti-apoptotica si esplica principalmente attraverso l'amplificazione del segnale di ERK fosforilato, mediante la sua capacità di inibire la fosfatasi PP2A responsabile della defosforilazione di questo fattore in corrispondenza della thr202 (70, 71). In questo studio abbiamo verificato che la riduzione dell'espressione dell'mRNA specifico per IER3, conseguente al silenziamento di Nupr1/p8, determina una riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK, suggerendo che, anche in questo modello tumorale, l'azione anti-apoptotica di IER3 si esplica attraverso la regolazione dello stato di attivazione di questa chinasi.

Studi condotti sul modello di tumore pancreatico hanno dimostrato che in risposta ad uno specifico stimolo di stress rappresentato dalla deprivazione di nutrienti (starvation), l'iperespressione di Nupr1/p8 determina una forte induzione dei livelli di espressione di RelB e IER3 allo scopo di favorire la sopravvivenza cellulare.

Per verificare se gli effetti biologici osservati sulle cellule dopo il silenziamento di Nupr1/p8 dipendessero dalla downregolazione di questi trascritti, sono stati condotti esperimenti di silenziamento genico utilizzando dei siRNA specifici per RelB e IER3 in cellule di HCC. Il silenziamento genico, condotto sulla linea cellulare Hep3B che mostra i livelli basali più alti del messaggero specifico per Nupr1/p8 fra quelle da noi utilizzate, ha dimostrato che, come Nupr1, RelB e IER3 favoriscono la sopravvivenza delle cellule tumorali e rappresentano fattori di resistenza al trattamento farmacologico con sorafenib.

Questi dati, in accordo con quanto già dimostrato nel carcinoma pancreatico, hanno suggerito l'esistenza di un pathway Nupr1/RelB/IER3 di sopravvivenza cellulare che determina la resistenza delle cellule tumorali di HCC al trattamento farmacologico con sorafenib.

Inoltre, l'analisi di DNA microarray condotta su cellule Hep3B stabilmente silenziate per Nupr1/p8 ha mostrato che il silenziamento di Nupr1/p8 regola l'espressione di oltre 300 geni, la maggior parte dei quali sembrano essere coinvolti, oltre che nella regolazione della sopravvivenza cellulare, nella regolazione del metabolismo lipidico: ciò ha suggerito un importante ruolo per Nupr1/p8 anche nel processo di steatogenesi. Per confermare questi dati, gli studi "ex vivo" condotti mediante analisi immunoistochimica, hanno mostrato che in pazienti affetti da steatoepatite non alcolica il livello di espressione di Nupr1/p8 è molto più elevato rispetto ai tessuti epatici sani. Inoltre, studi "in vitro" condotti sulle cellule Hep3B stabilmente silenziate per Nupr1/p8 hanno evidenziato che il silenziamento genico di Nupr1/p8 riduce significativamente l'accumulo di goccioline lipidiche intracellulari, in seguito al trattamento con un acido grasso insaturo come l'acido oleico.

D'altra parte, i dati dei microarray hanno consentito di identificare nuovi target di Nupr1/p8, alcuni dei quali (*RUNX2*, *TP63* e *CRY-2*) sono già stati validati tramite analisi di qPCR e sembrano avere un ruolo importante nella tumorigenesi, aprendo così la strada all'identificazione di nuovi pathway eventualmente aggredibili da terapie mirate.

In conclusione, i dati ottenuti hanno mostrato che il pathway Nupr1/p8/RelB/IER3 rappresenta un promettente target terapeutico per il trattamento dell'HCC in quanto la sua inattivazione potrebbe essere utile a prevenire la progressione tumorale e la formazione di metastasi. Inoltre, Nupr1/p8 sembra avere un ruolo fondamentale anche nel processo di steatogenesi in quanto il suo silenziamento riduce l'accumulo di goccioline lipidiche intracellulari: per questi motivi, Nupr1/p8 rappresenta un importante bersaglio terapeutico anche per il trattamento della steatosi epatica.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare sentitamente tutte le persone che hanno contribuito alla stesura di questo lavoro aiutandomi sempre con i loro consigli e la loro esperienza.

Innanzitutto desidero ringraziare il Dott Melchiorre Cervello, dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, per avermi permesso di svolgere gran parte del mio lavoro all'interno del suo laboratorio e per avermi sempre aiutata e guidata con la sua esperienza e la sua professionalità a superare ogni dubbio ed ostacolo incontrato durante il percorso che ha portato alla stesura di questa tesi.

Ringrazio il prof Giuseppe Montalto e la Dott.ssa Lydia Giannitrapani, del Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica dell'Università degli Studi di Palermo, per la loro immensa e cortese disponibilità.

Ringrazio la Sig.ra Antonina Azzolina, dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, per il suo aiuto sempre immediato nell'esecuzione degli esperimenti e per la sua insostituibile presenza in laboratorio.

Ringrazio la Dott.ssa Antonella Cusimano dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo per i suoi utili consigli e la sua preziosa collaborazione.

Ringrazio la Dott.ssa Giuseppa Augello e il Dott. Daniele Balasus per la loro sincera e proficua collaborazione.

Ringrazio la mia famiglia e soprattutto i miei genitori, sempre accanto a me nei momenti belli e in quelli più difficili che hanno caratterizzato tutto il mio percorso formativo, fino ad oggi: a loro dedico questo lavoro.

Bibliografia

1. Wong CM et al Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma –Liver International (2007) Review article.
2. El-SeraqHB, et al Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis – Gastroenterology 2007 June; 132 (7): 2557-76
3. Mendez-Sanchez N et al Sorafenib, a systemic therapy for hepatocellular carcinoma – Annals of Hepatology 2008; 7 (1): Jan-March: 46-51
4. Bruix J et al Focus on hepatocellular carcinoma – Cancer Cell 2004 Mar; 5 (3): 215-9
5. Llovet J.M., et al Hepatocellular carcinoma – Lancet 2003 362: 1907-1917
6. Manuale di Virologia Medica
7. Ierardi E et al From Chronic liver disorders to hepatocellular carcinoma: molecular and genetic pathway – World J Gastrointestestinal Oncology 2010 June 15; 2 (6): 259-261
8. Blonski W et al Non viral causes of hepatocellular carcinoma – World J Gastroenterology 2010 August 7; 16 (29): 3603-3615
9. Testino G et al Alcohol and gastrointestinal oncology – World J Gastrointestinal Oncology 2010 August 15; 2 (8): 322-325
10. Poschi G et al Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects –The Proceedings of the Nutritional Society 2004 February; 63 (1): 65-71
11. Oyagbem AA et al Hepatocellular carcinoma and Underlyng mechanisms – African Health Sciences Vol 10 n 1 March 2010. 93-98
12. Abotel-Hamid NM Recent insights on risk factors of HCC – World J Hepatology 2009 Oct. 31; 1 (1): 3-7
13. Herath NI et al Review of genetic and epigenetic alterations of hepatocarcinogenesis –J Gastroenterology Hepatol. 2006 Jan; 21 (1 Pt 1): 15-21
14. Aravalli RN et al Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma – Hepatology 2008 Dec.; 48 (6): 2047-63 Review
15. Jain S et al Molecular genetics of Hepatocellular neoplasia – American Journal of Translation Research 2010 January 23; 2 (1): 105-18
16. Shin-Maeda NF-kb, JNK and TLR signaling pathway in hepatocarcinogenesis – Gastroenterology Research and Practice 2010

17. Fabregat I Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells – *World J Gastroenterol* 2009 February 7; 15 (5): 513-520
18. Zhou L et al Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma - *World J Gastroenterol* 2006 February 28; 12(8):1175-1181
19. Llovet JM et al Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma *The New England Journale of Medicine* 2008;
20. Wilhelm SM et al. Bay 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the Raf/MEK/ERK pathway and receptors tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis *Cancer Research* 2004;
21. Rahamani M et al The Kinase Inhibitor Sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress *Molecular and Cellular Biology* 2007;
22. Li Liu et al Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5 *Cancer Research*
23. Rahmani M et al Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem* 2005;280:35217–27.
24. Shuda M et al Activation of ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis *Journal of Hepatology* 2003;
25. Chiou JF et al Glucose-related protein 78 is a novel contributor to acquisition of resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma - *Annals of surgical oncology* 2009;
26. Cervello M et al Molecular mechanisms of sorafenib action in human liver cancer cells *Cell Cycle* 11(15) 2012
27. Cervello M et al Novel Combination of Sorafenib and celecoxib Provides Synergistic Anti-Proliferative and pro-apoptotic Effects in Human Liver cancer cells *Plosone* 2013
28. Harding HP et al Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397: 271-274
29. Casagrande R et al Degradation of protein from the ER of *S. cervisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell* 2000; 5: 729-735

30. Friedlander et al A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 2000; 2:379-384
31. Travers KJ et al Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and Er-associated degradation. *Cell* 2000;101:249-258
32. Ma Y et al The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7:222-229
33. Rutkowski DT et al A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004; 14:20-28
34. Bertolotti A. et al Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol* 2000. 2, 326–332
35. Shen, J.S et al ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev. Cell* 2002 3, 99–111
36. Ray Kumar Yadav et al Endoplasmic Reticulum stress and cancer - *Journal of Cancer Prevention* 2014 19(2):75-88
37. McCullough KD Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biology* 2001 21(4):1249-59
38. Tabas I et al Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress *Nat Cell Biology* 2011 13(3).184-90
39. Sj Marciniak et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004;18(24):3066-77.
40. M calfon et al IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP1 Mrna *NATURE* 2002 415:92-96
41. AH. Lee et al XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response *Mol Cell Biol* 2003; 23:7448-7459
42. MS. Brown et al. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000; 1:391-398
43. J. Ye et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000; 6:1355-1364

44. K. Yamamoto et al. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive elements ERSE, PRE and ERSE-II. *J. Biochem* 2004; 136:343-350
45. Zhang Z. et al. Activating transcription factor 4 increases chemotherapeutics resistance of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2012 13 (6): 435-42
46. DeZwaan-McCabe D et al. The stress-regulated transcription factor CHOP promotes hepatic inflammatory gene expression, fibrosis, and oncogenesis. *PLoS Genet.* 2013;9(12)
47. Scaiewicz V, et al. CCAAT/enhancer-binding protein homologous (CHOP) protein promotes carcinogenesis in the DEN-induced hepatocellular carcinoma model. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12)
48. Mallo G et al Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration and which promotes cellular growth. *Journal of Biol Chem* 272, 32360-32369
49. Su, S.B., Motoo et al. Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 2001 (7), 1320–1324;
50. Su, S.B. Motoo et al. Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*; 2001 Feb;7(2):309-13
51. Ito Y et al Expression and cellular localization of p8 protein in thyroid neoplasms *Cancer Letters* 2003 203 (2): 237–244;
52. Ree AH et al. Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2000 ;6(5):1778-83
53. Cano C et al Nupr1: The Swiss-Knife of Cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2011 226(6):1439-43
54. Ree AH et al. Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Research* 1999 59(18):4675-80
55. Cano C et al Stress proteins and pancreatic Cancer Metastasis *The Scientific World Journal* 2010 10:1958-66
56. Ki-Sun K et al Expression and roles of Nupr1 in cholangiocarcinoma cells. *Anatomy and Cell Biology* 2012 45(1):17-25

57. Malicet C et al Interaction of the stress protein p8 with jab1 is required for jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 339:284-289
58. Su SB et al. Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001 7: 1320-1324
59. Ito Y et al Expression of p8 protein in breast carcinoma: an inverse relationship with apoptosis. *Anticancer Res* 2005 25:833-837
60. Malicet C et al Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex. *Proc Natl Acad sci USA* 2006 103: 2671-2676
61. Kong DK et al Deficiency of the transcriptional regulator p8 results in increased autophagy and apoptosis, and causes impaired heart function. *Mol Biol Cell* 2010 21:1335-1349
62. Carracedo A The stress-regulated protein p8 mediated cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells *Cancer Cell* 2006 9, 301-312
63. Hamidi T et al Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis - *Journal of Clinical Investigation* 2012 122(6): 2092-2103
64. Giroux V et al p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells - *Clinical Cancer Research* 2006 12:235;
65. Vincent Aj et al Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance Nupr1 and p21 in chemoresistance. *FEBS Letters* 2012 586: 3429-3434
66. Taieb D et al Inactivation of stress protein p8 increases murine carbon tetrachloride hepatotoxicity via preserved CYP2E1 activity. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):176-82.
67. Huang J et al Progressive Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to Hepatocarcinogenesis in Fatty Acyl-CoA Oxidase 1-Deficient Mice - *The American Journal of Pathology* 2011 179 (2)
68. Chowdhury Ur et al Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer biology *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28: 225-232
69. 69 p8 Expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis *Journal of Cellular Physiology* 2011 226(12): 3442-345
70. Letourneux C et al B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO j* 2006 25(4):727-38

71. Garcia MN et al IER3 supports KRasG12D-dependent pancreatic cancer development by sustaining ERK1/2 phosphorylation. *Journal of Clinical Investigation* 2014 124(11): 4709-22
72. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(9):1161–1179.
73. Guerin S, Baron ML, Valero R, Herrant M, Auburger P, Naquet P. RelB reduces thymocyte apoptosis and regulates terminal thymocyte maturation. *Eur J Immunol.* 2002;32(1):1–9.
74. Vasseur S. et al Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion and transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) and C/EBP beta transacting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter. *Biochem J* 1999 343: 377-383
75. Kallwellis K et al tumor necrosis factor alpha induces the expression of the nuclear protein p8 via a novel NFkappaB binding site within the promoter. *Horm Metab res* 38(9):570-574
76. Hsu HT et al High cytoplasmic expression of Krüppel-like factor 4 is an independent prognostic factor of better survival in hepatocellular carcinoma - *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 9894-9906
77. Li Q et al Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012 Sep;143(3):799-810
78. Wei D et al KLF4 α up-regulation promotes cell cycle progression and reduces survival time of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010; 139(6): 2135–2145.

